

P/INT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 25 August 2000 (25.08.00)	
International application No. PCT/EP00/00876	Applicant's or agent's file reference 19503P WO
International filing date (day/month/year) 03 February 2000 (03.02.00)	Priority date (day/month/year) 03 February 1999 (03.02.99)
Applicant BECKER, Peter et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 July 2000 (07.07.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Zakaria EL KHODARY

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

WO 00/46600 A2
[with revisions]

Job No.: 1616-84076A

Translated from German by the Ralph McElroy Translation Company
910 West Avenue, Austin, Texas 78701 USA

Ref.: 77777/7726426

PATENT COOPERATION TREATY

Sender: AGENCY TASKED WITH THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINATION

To: WEICKMANN WEICKMANN HUBER LISKA PRECHTEL BÖHM WEISS TIESMEYER HERZOG RUTTENSBERGER JORDAN Kopernikusstrasse 9 D-81679 Munich GERMANY	[stamp:] RECEIVED May 16, 2001 Rec.:
File Number of the Applicant or Attorney 19503P WO	

PCT

NOTIFICATION CONCERNING THE
TRANSMISSION OF THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(Rule 71.1 PCT)

Date Sent: (Day/Month/Year)	5/15/2001
IMPORTANT NOTIFICATION	
International Application Number PCT/EP00/00876 -	International Application Date (Day/Month/Year) 2/3/2000
	Priority Date (Day/Month/Year) 2/3/1999

Applicant
EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE et al.

1. The applicant is informed that the agency tasked with the international preliminary examination is transmitting herewith the international preliminary examination report developed for the international application with the relevant attachments if necessary.
2. A copy of the report, with the relevant attachments if necessary, is being transmitted to the International Bureau for further forwarding to all selected offices.
3. On request of a selected office, the International Bureau will prepare a translation of the report (but not the attachments) into English and transmit it to the office.

4. REMINDER

For entry into the national phase the applicant has to perform (Article 39 (1)) (see also the information transmitted in Form PCT/IB/301) certain transactions (filing of translations and payment of national fees) before each selected office within 30 months of the priority date (or still later in many offices).

If a translation of the international application is to be transmitted to a selected office, then this translation must also contain a translation of all attachments to the international preliminary examination report. It is the responsibility of the applicant to prepare such translations and transmit them directly to the relevant offices.

Further details concerning the authoritative deadlines and requirements of the selected offices are to be found in Volume II of the PCT guide for applicants.

Name and Address of the Agency Tasked with the International Examination [logo] Europäisches Patentamt D-80296 München Tel. +49 89 2399- 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Official Siedsma, Y. Tel. +49 89 2399	[logo]
--	--	--------

PATENT COOPERATION TREATY
PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(Article 36 and Rule 70 PCT)

File Number of the Applicant or Attorney 19503 WO	ADDITIONAL PROCESSING see notification concerning the transmission of the international preliminary examination (Form PCT/IPEA/416)	
International Application Number PCT/EP00/00876	International Application Date (Day/Month/Year) 2/3/2000	Priority Date (Day/Month/Year) 2/3/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N33/543		
Applicant EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE et al..		
<p>1. This international preliminary examination report was developed by the agency tasked with the international preliminary examination and is being transmitted to the applicant pursuant to Article 36.</p> <p>2. This REPORT includes 5 pages in all including this cover sheet.</p> <p style="margin-left: 40px;"><input checked="" type="checkbox"/> Furthermore, ATTACHMENTS accompany the report. They are pages with descriptions, claims, and/or drawings which were changed and are based on this report, and/or pages with corrections done before this agency (see Rule 70.16 and Section 607 of the Management Guidelines for the PCT).</p> <p style="margin-left: 40px;">These attachments include 35 pages in all.</p>		
<p>3. This report contains specifications concerning the following points:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> No development of an opinion concerning novelty, inventive activity, and commercial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Insufficient unity of the invention V <input checked="" type="checkbox"/> Substantiated finding according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive activity, and commercial applicability; documents and explanations in support of this finding VI <input type="checkbox"/> Certain cited documents VII <input type="checkbox"/> Certain deficiencies in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain notes concerning the international application 		
Date of Filing of the Application 7/7/2000	Date of Completion of the Report 5/15/2001	
Name and Address of the Agency Tasked with the International Examination [logo] Europäisches Patentamt D-80296 München Tel. +49 89 2399 – 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 – 4465		Authorized Official Goetz, M. [logo] Tel. No. +49 89 2399 8697

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International File No.: PCT/EP00/00876

I. Basis of the report

1. 1. With regard to the components of the international application (*Replacement pages that were submitted to the filing office in response to a request pursuant to Article 14 are considered "originally submitted" in the context of this report and are not appended to it, because they do not contain any amendments (Rules 70.16 and 70.17))*):

Specification, pages:

1-3, 3a-3b, 4-26 submitted on March 23, 2001 with letter of March 23, 2001

Claims, No.:

1-27 submitted on March 23, 2001 with letter of March 23, 2001

Drawings, sheets:

1/1 original version

2. With regard to the language: All the above-mentioned components were available to the authority in the language in which the international application had been submitted, or they were submitted in that language, unless information to the contrary is given under this point. The components were available to the authority in the language, or were submitted in this language, namely

- ☐ the language of the translation, which was submitted for the purposes of the international search (pursuant to Rule 23.1 (b)).
- ☐ The publication language of the international application (pursuant to Rule 48.3 (b)).
- ☐ The language of the translation which was submitted for the purpose of the international preliminary examination (pursuant to Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to the nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence protocol which:

- ☐ is contained in writing in the international application.
- ☐ was submitted together with the international application in a computer readable form.
- ☐ was subsequently submitted to the authority in written form.

EXAMINATION REPORT**INTERNATIONAL PRELIMINARY**
International File No.: PCT/EP00/00876

- ☐ was subsequently submitted to the authority in a computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently submitted written sequence protocol does not go beyond the disclosure content of the international application at the time of the application was submitted.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form corresponds to the written sequence protocol was submitted.
4. Because of the amendments, the following documents have been removed:
- ☐ Specification Pages:
- ☐ Claims No.:
- ☐ Drawings Sheets:
5. ☐ This report was prepared without taking account of (some of) the amendments since, in the view of the agency, these go beyond the disclosure in the originally submitted version, for the reasons stated (Rule 70.2(c)):
6. Any other remarks:

IV. Lack of unity of the invention

1. Upon the request to limit the claims or to pay additional fees, the applicant has:
- ☐ limited the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees with opposition.
- ☐ neither limited the claims nor paid additional fees.
2. ☐ The authority has noted that the requirement of unity of the invention has not been fulfilled, and pursuant to Rule 68.1 it has decided not to request that the applicant limit the claims or pay additional fees.

EXAMINATION REPORT

INTERNATIONAL PRELIMINARY
International File No.: PCT/EP00/00876

3. The authority is of the opinion that the requirement of unity of the invention according to Rules 13.1, 13.2 and 13.3

- ☒ has been met
- ☐ has not been met for the following reason:

4. Therefore, for the preparation of this report, an international preliminary examination was carried out for the following parts of the international application:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts which pertain to Claims No.

V. Substantiated determination per Article 35(2) regarding novelty, inventive step and commercial applicability; documents and statements to support the determination

1. Determination

Novelty (N)	Yes: Claims 1-27 No: Claims
Inventive step(IS)	Yes: Claims 1-27 No: Claims
Commercial applicability (CA)	Yes: Claims 1-27 No: Claims

2. Documents and statements
see appendix

WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on
the basis of the Patent Cooperation Treaty

INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 00/46600 A2

International Patent Classification⁷: G 01 N 33/543

International Filing No.: PCT/EP00/00876

International Filing Date: February 3, 2000

International Publication Date: August 10, 2000

Priority

Date: February 3, 1999
Country: DE
No.: 199 04 288.8

Date: August 17, 1999
Country: DE
No.: 199 38 839.3

METHOD OF DETECTING ANALYTES IN A SAMPLE AND SUPPORT FOR THIS
PURPOSE

Inventor; and
Inventor/Applicant (only for US):

Peter Becker [DE/DE]
Schützenstrasse 1a
D-69123 Heidelberg (DE)

Heinrich Hörber [DE/DE]
Schichtlingastrasse 3
D-91744 Weilingen (DE)

Applicant (for all designated
states except US):

EUROPÄISCHES
LABORATORIUM FÜR
MOLEKULAR-BIOLOGIE
(EMBL) [DE/DE]
Meyerhofstrasse 1
D-69117 Heidelberg (DE)

Agent:

H. Weickmann et al.
Kopernikusstrasse 9
D-81679 Munich (DE)

Designated States:

AU, CA, CN, JP, US, European
Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE).

Published

Without International Search Report and must be published again after reception
of the report.

//insert English abstract and figure//

FOR INFORMATION ONLY

Codes for the identification of PCT contract states on the cover sheets of the documents that publish the international applications in accordance with the PCT.

AL	Albania	KE	Kenya	TG	Togo
AM	Armenia	KG	Kyrgyzstan	TJ	Tajikistan
AT	Austria	KP	Democratic People's	TM	Turkmenistan
AU	Australia		Republic of Korea	TR	Turkey
AZ	Azerbaijan	KR	Republic of Korea	TT	Trinidad and Tobago
BA	Bosnia-Herzegovina	KZ	Kazakhstan	UA	Ukraine
BB	Barbados	LC	Saint Lucia	UG	Uganda
BE	Belgium	LI	Liechtenstein	US	United States of
BF	Burkina Faso	LK	Sri Lanka		America
BG	Bulgaria	LR	Liberia	UZ	Uzbekistan
BJ	Benin	LS	Lesotho	VN	Vietnam
BR	Brazil	LT	Lithuania	YU	Yugoslavia
BY	Belarus	LU	Luxembourg	ZW	Zimbabwe
CA	Canada	LV	Latvia		
CF	Central African	MC	Monaco		
	Republic	MD	Republic of Moldavia		
CG	Congo	MG	Madagascar		
CH	Switzerland	MK	Macedonia (former		
CI	Côte d'Ivoire		Yugoslavian Republic		
CM	Cameroon		of Macedonia)		
CN	China	ML	Mali		
CU	Cuba	MN	Mongolia		
CZ	Czech Republic	MR	Mauritania		
DE	Germany	MW	Malawi		
DK	Denlabel	MX	Mexico		
EE	Estonia	NE	Niger		
ES	Spain	NL	Netherlands		
FI	Finland	NO	Norway		
FR	France	NZ	New Zealand		
GA	Gabon	PL	Poland		
GB	United Kingdom	PT	Portugal		
GE	Georgia	RO	Romania		
GH	Ghana	RU	Russian Federation		
GN	Guinea	SD	Sudan		
GR	Greece	SE	Sweden		
HU	Hungary	SG	Singapore		
IE	Ireland	SI	Slovenia		
IL	Israel	SK	Slovakia		
IS	Iceland	SN	Senegal		
IT	Italy	SZ	Swaziland		
JP	Japan	TD	Chad		

International Preliminary Search Report—Added Sheet

International Application No. PCT/EP00/00876

On point V

Reasoned statement pursuant to Article 35(2) with regard to the novelty, the inventive activity and the susceptibility of industrial application; documents and explanations in support of this determination

1. Although documents D1-D4 describe differently designed supports in the CD disc format for the immunological analysis as well as methods for their preparation and their use, see

- D1, Figures 1-3, page 2/line 22 – page 3/line 2, page 6/line 18 – page 7/line 13, page 7/lines 17-23, page 10/line 16 – page 11/line 20, page 12/lines 7-13 and page 14/lines 5-18;
- D2, page 5/last paragraph – page 6/second paragraph, page 7/second and last paragraph/ page 8/last paragraph – page 9/first paragraph, page 15/second paragraph – page 16/second paragraph, page 17/last paragraph – page 21/first paragraph;
- D3, page 9/lines 15-37, page 10/lines 32-37, page 20/line 27 – page 26/line 16, page 32/lines 17-27, page 62/lines 31-34, Claims 18-26, 31 and 33;
- D4, Figure 1 and page 4/line 1 – page 5/line 7 and Claims 1-18,

the application of the reflector in the form of a reflecting layer, which is applied on the substrate (3) over the detection fields (5,7) (Claims 1 and 18) as well as the application of a planar magnetic layer (Claim 23) are not disclosed or obviously suggested according to the current state of knowledge by any of the cited oppositions.

2. Claims 1-27 therefore satisfy the prerequisites pursuant to Article 33(2)-(4) PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

CT/EP 00/00876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/551 G11B7/013

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N G11B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ✓	WO 96 09548 A (GORDON JOHN FRANCIS ;UNIV DUNDEE (GB)) 28 March 1996 (1996-03-28) page 2, line 22 -page 3, line 2 page 6, line 18 -page 7, line 13 page 7, line 17-23 page 10, line 16 -page 11, line 20 page 12, line 7-13 page 14, line 5-18 page 8, line 15-19 figures 1-3	1,4-10, 12,17, 18,20, 31-33
Y	----- -/-	26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2000

Date of mailing of the international search report

20.10.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Goetz, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/00876

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ✓	WO 98 12559 A (DEMERS JAMES P) 26 March 1998 (1998-03-26) page 5, last paragraph -page 6, paragraph 2 page 7, paragraph 2 page 7, last paragraph page 8, last paragraph -page 9, paragraph 1 page 15, paragraph 2 -page 16, paragraph 2 page 17, last paragraph -page 21, paragraph 1	1,5-10, 17,18, 20,31-33
Y		26
X ✓	WO 98 01533 A (BURSTEIN LAB INC) 15 January 1998 (1998-01-15) page 9, line 15-37 page 10, line 32-37 page 20, line 27 -page 26, line 16 page 32, line 17-27 page 52, line 18 -page 54, line 7 page 62, line 31-34 claims 18-26,31,33	20, 26-29, 31-33
Y ✓	WO 96 05326 A (FOX JOHN S) 22 February 1996 (1996-02-22) page 4, line 1 -page 5, line 7 claims 1-18; figure 1	26
A ✓	T. SCHALKHAMMER: "Metal nano clusters as transducers for bioaffinity interactions" MONTASHEFTE FÜR CHEMIE/CHEMICAL MONTHLY, vol. 129, no. 10, 1998, pages 1067-1092, XP000917114 abstract	1-25

WO 00/46600 A2
[without revisions]

PATENT COOPERATION TREATY

Sender: AGENCY TASKED WITH THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINATION

To:
WEICKMANN WEICKMANN HUBER LISK
PRECHTEL BÖHM WEISS TIESMEYER HERZOG
RUTTENSBERGER JORDAN
Kopernikusstrasse 9
D-81679 Munich
GERMANY

[stamp:]
RECEIVED
May 16, 2001
Rec.:

File Number of the Applicant or Attorney
19503P WO

PCT

NOTIFICATION CONCERNING THE
TRANSMISSION OF THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(Rule 71.1 PCT)

Date Sent: 5/15/2001
(Day/Month/Year)

IMPORTANT NOTIFICATION

International Application Number
PCT/EP00/00876 -

International Application Date (Day/Month/Year)
2/3/2000

Priority Date (Day/Month/Year)
2/3/1999

Applicant
EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE et al.

1. The applicant is informed that the agency tasked with the international preliminary examination is transmitting herewith the international preliminary examination report developed for the international application with the relevant attachments if necessary.
2. A copy of the report, with the relevant attachments if necessary, is being transmitted to the International Bureau for further forwarding to all selected offices.
3. On request of a selected office, the International Bureau will prepare a translation of the report (but not the attachments) into English and transmit it to the office.
4. REMINDER

For entry into the national phase the applicant has to perform (Article 39 (1)) (see also the information transmitted in Form PCT/IB/301) certain transactions (filing of translations and payment of national fees) before each selected office within 30 months of the priority date (or still later in many offices).

If a translation of the international application is to be transmitted to a selected office, then this translation must also contain a translation of all attachments to the international preliminary examination report. It is the responsibility of the applicant to prepare such translations and transmit them directly to the relevant offices.

Further details concerning the authoritative deadlines and requirements of the selected offices are to be found in Volume II of the PCT guide for applicants.

Name and Address of the Agency Tasked with the International Examination
[logo] Europäisches Patentamt
D-80296 München
Tel. +49 89 2399- 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Official

Siedsma, Y.

Tel. +49 89 2399

[logo]

PATENT COOPERATION TREATY
PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(Article 36 and Rule 70 PCT)

File Number of the Applicant or Attorney 19503 WO	ADDITIONAL PROCESSING see notification concerning the transmission of the international preliminary examination (Form PCT/IPEA/416)
International Application Number PCT/EP00/00876	International Application Date (Day/Month/Year) 2/3/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N33/543	Priority Date (Day/Month/Year) 2/3/1999
Applicant EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE et al..	
<p>1. This international preliminary examination report was developed by the agency tasked with the international preliminary examination and is being transmitted to the applicant pursuant to Article 36.</p> <p>2. This REPORT includes 5 pages in all including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Furthermore, ATTACHMENTS accompany the report. They are pages with descriptions, claims, and/or drawings which were changed and are based on this report, and/or pages with corrections done before this agency (see Rule 70.16 and Section 607 of the Management Guidelines for the PCT).</p> <p>These attachments include 35 pages in all.</p>	
<p>3. This report contains specifications concerning the following points:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> No development of an opinion concerning novelty, inventive activity, and commercial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Insufficient unity of the invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Substantiated finding according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive activity, and commercial applicability; documents and explanations in support of this finding</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain cited documents</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain deficiencies in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain notes concerning the international application</p>	
Date of Filing of the Application 7/7/2000	Date of Completion of the Report 5/15/2001
Name and Address of the Agency Tasked with the International Examination [logo] Europäisches Patentamt D-80296 München Tel. +49 89 2399 – 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 – 4465	Authorized Official Goetz, M. Tel. No. +49 89 2399 8697 [logo]

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International File No.: PCT/EP00/00876

I. Basis of the report

1. 1. With regard to the components of the international application (*Replacement pages that were submitted to the filing office in response to a request pursuant to Article 14 are considered "originally submitted" in the context of this report and are not appended to it, because they do not contain any amendments (Rules 70.16 and 70.17):*

Specification, pages:

1-3, 3a-3b, 4-26 submitted on March 23, 2001 with letter of March 23, 2001

Claims, No.:

1-27 submitted on March 23, 2001 with letter of March 23, 2001

Drawings, sheets:

1/1 original version

2. With regard to the language: All the above-mentioned components were available to the authority in the language in which the international application had been submitted, or they were submitted in that language, unless information to the contrary is given under this point. The components were available to the authority in the language, or were submitted in this language, namely

- ☐ the language of the translation, which was submitted for the purposes of the international search (pursuant to Rule 23.1 (b)).
- ☐ The publication language of the international application (pursuant to Rule 48.3 (b)).
- ☐ The language of the translation which was submitted for the purpose of the international preliminary examination (pursuant to Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to the nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence protocol which:

- ☐ is contained in writing in the international application.
- ☐ was submitted together with the international application in a computer readable form.
- ☐ was subsequently submitted to the authority in written form.

EXAMINATION REPORT**INTERNATIONAL PRELIMINARY**
International File No.: PCT/EP00/00876

- ☐ was subsequently submitted to the authority in a computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently submitted written sequence protocol does not go beyond the disclosure content of the international application at the time of the application was submitted.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form corresponds to the written sequence protocol was submitted.
4. Because of the amendments, the following documents have been removed:
- ☐ Specification Pages:
- ☐ Claims No.:
- ☐ Drawings Sheets:
5. ☐ This report was prepared without taking account of (some of) the amendments since, in the view of the agency, these go beyond the disclosure in the originally submitted version, for the reasons stated (Rule 70.2(c)):
6. Any other remarks:

IV. Lack of unity of the invention

1. Upon the request to limit the claims or to pay additional fees, the applicant has:
- ☐ limited the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees with opposition.
- ☐ neither limited the claims nor paid additional fees.
2. ☐ The authority has noted that the requirement of unity of the invention has not been fulfilled, and pursuant to Rule 68.1 it has decided not to request that the applicant limit the claims or pay additional fees.

EXAMINATION REPORT**INTERNATIONAL PRELIMINARY
International File No.: PCT/EP00/00876**

3. The authority is of the opinion that the requirement of unity of the invention according to Rules 13.1, 13.2 and 13.3

- ☒ has been met
- ☐ has not been met for the following reason:

4. Therefore, for the preparation of this report, an international preliminary examination was carried out for the following parts of the international application:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts which pertain to Claims No.

V. Substantiated determination per Article 35(2) regarding novelty, inventive step and commercial applicability; documents and statements to support the determination

1. Determination

Novelty (N)	Yes: Claims 1-27 No: Claims
Inventive step(IS)	Yes: Claims 1-27 No: Claims
Commercial applicability (CA)	Yes: Claims 1-27 No: Claims

**2. Documents and statements
see appendix**

WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY
 International patent published on
 the basis of the Patent Cooperation Treaty
 INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 00/46600 A2

International Patent Classification ⁷ :	G 01 N	33/543
International Filing No.:	PCT/EP00/00876	
International Filing Date:	February 3, 2000	
International Publication Date:	August 10, 2000	
Priority		
Date:	February 3, 1999	
Country:	DE	
No.:	199 04 288.8	
Date:	August 17, 1999	
Country:	DE	
No.:	199 38 839.3	

METHOD OF DETECTING ANALYTES IN A SAMPLE AND SUPPORT FOR THIS
 PURPOSE

Inventor; and Inventor/Applicant (only for US):	Peter Becker [DE/DE] Schützenstrasse 1a D-69123 Heidelberg (DE)
	Heinrich Hörber [DE/DE] Schichtlingastrasse 3 D-91744 Weiltingen (DE)
Applicant (for all designated states except US):	EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULAR-BIOLOGIE (EMBL) [DE/DE] Meyerhofstrasse 1 D-69117 Heidelberg (DE)

Agent:

H. Weickmann et al.
Kopernikusstrasse 9
D-81679 Munich (DE)

Designated States:

AU, CA, CN, JP, US, European
Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE).

Published

Without International Search Report and must be published again after reception
of the report.

//insert English abstract and figure//

FOR INFORMATION ONLY

Codes for the identification of PCT contract states on the cover sheets of the documents that publish the international applications in accordance with the PCT.

AL	Albania	KE	Kenya	TG	Togo
AM	Armenia	KG	Kyrgyzstan	TJ	Tajikistan
AT	Austria	KP	Democratic People's	TM	Turkmenistan
AU	Australia		Republic of Korea	TR	Turkey
AZ	Azerbaijan	KR	Republic of Korea	TT	Trinidad and Tobago
BA	Bosnia-Herzegovina	KZ	Kazakhstan	UA	Ukraine
BB	Barbados	LC	Saint Lucia	UG	Uganda
BE	Belgium	LI	Liechtenstein	US	United States of
BF	Burkina Faso	LK	Sri Lanka		America
BG	Bulgaria	LR	Liberia	UZ	Uzbekistan
BJ	Benin	LS	Lesotho	VN	Vietnam
BR	Brazil	LT	Lithuania	YU	Yugoslavia
BY	Belarus	LU	Luxembourg	ZW	Zimbabwe
CA	Canada	LV	Latvia		
CF	Central African	MC	Monaco		
	Republic	MD	Republic of Moldavia		
CG	Congo	MG	Madagascar		
CH	Switzerland	MK	Macedonia (former		
CI	Côte d'Ivoire		Yugoslavian Republic		
CM	Cameroon		of Macedonia)		
CN	China	ML	Mali		
CU	Cuba	MN	Mongolia		
CZ	Czech Republic	MR	Mauritania		
DE	Germany	MW	Malawi		
DK	Denmark	MX	Mexico		
EE	Estonia	NE	Niger		
ES	Spain	NL	Netherlands		
FI	Finland	NO	Norway		
FR	France	NZ	New Zealand		
GA	Gabon	PL	Poland		
GB	United Kingdom	PT	Portugal		
GE	Georgia	RO	Romania		
GH	Ghana	RU	Russian Federation		
GN	Guinea	SD	Sudan		
GR	Greece	SE	Sweden		
HU	Hungary	SG	Singapore		
IE	Ireland	SI	Slovenia		
IL	Israel	SK	Slovakia		
IS	Iceland	SN	Senegal		
IT	Italy	SZ	Swaziland		
JP	Japan	TD	Chad		

International Preliminary Search Report—Added Sheet

International Application No. PCT/EP00/00876

On point V

Reasoned statement pursuant to Article 35(2) with regard to the novelty, the inventive activity and the susceptibility of industrial application; documents and explanations in support of this determination

1. Although documents D1-D4 describe differently designed supports in the CD disc format for the immunological analysis as well as methods for their preparation and their use, see

- D1, Figures 1-3, page 2/line 22 – page 3/line 2, page 6/line 18 – page 7/line 13, page 7/lines 17-23, page 10/line 16 – page 11/line 20, page 12/lines 7-13 and page 14/lines 5-18;

- D2, page 5/last paragraph – page 6/second paragraph, page 7/second and last paragraph/ page 8/last paragraph – page 9/first paragraph, page 15/second paragraph – page 16/second paragraph, page 17/last paragraph – page 21/first paragraph;

- D3, page 9/lines 15-37, page 10/lines 32-37, page 20/line 27 – page 26/line 16, page 32/lines 17-27, page 62/lines 31-34, Claims 18-26, 31 and 33;

- D4, Figure 1 and page 4/line 1 – page 5/line 7 and Claims 1-18,

the application of the reflector in the form of a reflecting layer, which is applied on the substrate (3) over the detection fields (5,7) (Claims 1 and 18) as well as the application of a planar magnetic layer (Claim 23) are not disclosed or obviously suggested according to the current state of knowledge by any of the cited oppositions.

2. Claims 1-27 [as amended] therefore satisfy the prerequisites pursuant to Article 33(2)-(4) PCT.

Method of detecting analytes in a sample and support for this purpose

Description

The invention relates to the detection of analytes in a sample. Examples of possible analytes are proteins, peptides, nucleic acids and their derivatives, as well as molecules which can bind to them.

A potential sample is any sample which is suspected to contain at least a part of the sought analytes. Examples include, a blood sample, a serum sample and/or a urine sample, or in general any solution which contains the sought analytes.

For the detection of analytes in a sample, it is known to use so-called binding assays. In such binding assays, in general, analytes are detected by their specific interactions with receptors. Examples of such interactions are protein/protein interactions which occur, for example, during gene expression, enzyme/substrate or enzyme/effect or interactions which occur in metabolism, or protein/DNA or protein/RNA interactions which occur during gene expression. A systematic understanding of these molecular interactions is a prerequisite for the understanding of all biological processes both in normal and in diseased cells.

Furthermore, binding assays can be used to detect nucleic acids. DNA/DNA interactions play a principal role in molecular biology, particularly in the identification of genes and in strategies for mapping DNA, in the detection and quantification of gene expression as well as in the molecular diagnosis or therapy of diseases. Naturally, DNA/RNA and RNA/RNA interactions are also possibilities.

Because of the large number of genes, proteins, chemical effectors and RNA aptamers, an understanding of or intervention in biochemical processes often requires the identification, quantification or classification of a multitude of molecular interactions or the identification of effective interaction partners from a large number of possible combinations. The screening and analyzing of a large number of molecular interactions is, however, frequently limited with the methods known in the state of the art.

Often, samples are to be examined for a multitude of analytes. Consequently, the problem of large data quantities for evaluation arises. However, to be successful in practice, the evaluation must be possible in a reasonable time period. Known analysis systems have been shown to be only satisfactory to a limited degree.

From an article entitled "Metal Nano Clusters as Transducers for Bioaffinity Interactions" by Thomas Schalkhammer in *Monatshefte für Chemie* 000, 1-26, Springer-Verlag 1998, pp. 1-26, a sensor setup is known for biorecognitive binding processes and catalytic-enzymatic processes in which a mirror layer made of silver is arranged under a polycarbonate substrate, and on top of it a separation layer made of a polymer material is arranged. The separation layer

serves as the carrier for the binders which are immobilized on it. The evaluation is carried out with the aid of metal clusters, by means of which the analytes to be detected are labelled, and then are engaged in an electromagnetic interaction with the metallic mirror layer. In sensor areas with strong overlap with bound metal clusters, light which is radiated from the side of the mirror layer which is turned away from the polycarbonate substrate is absorbed more strongly than in overlap-free or less overlapping sensor areas, which makes it possible to make an optical read-out of the sensor via absorption measurements.

For the function of these known sensors, the thickness of the separation layer is a decisive parameter. This thickness must be chosen in a predetermined range, which is dependent on the wavelength of the light which is irradiated during the subsequent evaluation. In particular, one must ensure that the separation layer has an even thickness throughout its entire extent. To achieve this requirement, high manufacturing technology costs are required.

In the referenced article, reading devices are already proposed for the optical evaluation of this sensor; these devices also make it possible to manage larger data quantities, using other CD-ROM reading devices.

The problem of the invention is to indicate a way which, at lower cost, not only with regard to the data technological evaluation, but also with regard to the preparation of the sensor, allows the examination of a sample for a large number of analytes.

In the solution of this problem, the invention, according to a first aspect, is based on a method for the detection of analytes in a sample, in which analyte-specific binders are immobilized in a multitude of detection fields, on one of the planar faces of a disc-shaped substrate, and then the sample is contacted with the detection fields, and subsequently the presence and/or the quantity of the analytes to be detected is (are) determined by the optical evaluation of the detection fields.

The invention provides for the use of a substrate made of an optically transparent material; it provides detection fields which are arranged along at least one spiral line and/or a multitude of concentric circular lines which are distributed on the substrate; after contacting the sample with the detection fields, an optical reflector is arranged adjacently on the planar face of the substrate which carries the detection fields.

In the invention, the detection fields can be formed directly on the substrate. Here it is recommended to pretreat the substrate surface first chemically, or by a pretreatment with an oxygen plasma, or to effect a modification of the surface by a pretreatment with an oxygen plasma. This modification can facilitate the application of the binder for the formation of the analyte-specific detection fields. Accordingly, no separation layer with a thickness which must be precisely maintained needs to be applied on the substrate under the binder according to the

invention, as was necessary in the sensor known from Schalkhammer. Consequently, the cost of the finishing technology is reduced.

The reflector is required for the optical evaluation of the assay. It can be formed by a reflecting layer which is applied, after the completion of the biomolecular process steps, to the substrate over the detection fields. Because of their good reflection capacities, it is recommended to use metallic materials. In principle it is also conceivable to other materials, for example, dielectrics. It is preferred to form the reflecting layer from aluminum. It is also conceivable to use silver as the material for the reflecting layer. The reflecting layer can be formed by chemical vapor phase application. However, it is also possible to apply by gluing a prefabricated reflective film on the substrate.

Alternatively it is conceivable to arrange the reflector at a separation from the substrate, that is; not to apply it directly to the substrate. For example, the reflector can be made of a mirror plate which is applied in an evaluation apparatus, which is used for the evaluation of the assay.

The optical transparency of the substrate, together with the reflector which is arranged on the side of the detection fields which is at a distance from the substrate, allows the use of the hardware of commercial CD reading devices for the optical evaluation of this biomolecular sensor according to the invention. In particular in the case of a spiral arrangement of the detection fields and the design of the reflector as a reflecting layer which is applied directly on the substrate, such commercial CD reading devices can be modified at relatively low cost, to allow the desired information to be filtered out of the reflected light of the laser beam which scans the detection fields. It is conceivable that this process requires only software modifications. Even in the case of a circular arrangement of the detection fields, the technology of such CD reading devices can in principle be used, provided the construction and software prerequisites have been created to allow the laser beam which scans the detection fields to jump from circular line to circular line.

It is particularly appropriate to use a CD-ROM reader, which, if embedded in a computer architecture, allows the user the possibility to define the evaluation software himself/herself.

The evaluation of the detection fields can yield quantitative as well as qualitative information, depending on the chosen evaluation algorithm. Using appropriate labels, the optical properties, in particular the absorption behavior, of detection fields in which the analytes have become bound to receptors, can be made distinguishable from detection fields to whose receptors no analytes have become bound. In this manner it is possible, for example, via absorption measurements, to recognize those detection fields which carry analytes after the completion of the biomolecular process steps. First, this would constitute purely qualitative information. If, in addition, one wishes to obtain quantitative information, it is conceivable to scan the detection fields several times and to change, stepwise from scanned passage to scanned passage, a

threshold which is taken during the evaluation as the decision limit between the presence and absence of analytes. In this manner, statements can also be made regarding the quantity of the analytes which remain bound in the different detection fields.

If the assay read out uses an optional suitably adapted CD-ROM drive, a connected computer allows the user to further process the data quantity produced by the drive, where the user can store the results of this further processing in external data storage devices, for example, to prepare data banks on patients. For the data storage, conventional standard storage devices can be used, for example, hard discs or floppy discs. With the aid of the computer, it is possible to carry out a rapid evaluation of the data stream of the drive. The capacity of conventional computers and storage systems is generally sufficient, even for complex gene analyses.

As a rule it will be desirable to maintain sharply delimited detection fields, which, in addition, should be very small, to allow the accommodation of a sufficient number of detection fields on the substrate disc, which is advantageously the size of a conventional CD (compact disc). If one starts with the assumption that the radial separation between two successive spiral windings is advantageously approximately $1.6\text{ }\mu\text{m}$, then it is recommended to apply the binders in fields which have a radial width of not more than $1\text{ }\mu\text{m}$, so that a sufficient separation exists between radially adjacent detection fields, with reference to the axis of the disc, and each individual detection field as such can be resolved as to location. It is even preferred that the detection fields are radially smaller than $1\text{ }\mu\text{m}$, where it can be advantageous to form them so they have a radial width which corresponds essentially to that of the width of the data depressions burned into conventional CDs (so-called pits, namely approximately $0.5\text{ }\mu\text{m}$). At the same time it is recommended to arrange detection fields which are adjacent to each other at intervals from each other along the spiral line or along a circular line, to allow the individual resolution by the evaluation system. The detection fields can be in the form of essentially square or circular surfaces. It is also conceivable to form them longitudinally, in accordance with the shape of the data pits of conventional CDs in the circumferential direction, that is in the spiral or circular line direction, with an approximately oval or rectangular shape.

To apply the binder under the above outlined dimensional framing conditions for the detection fields on the substrate, it is particularly suitable to use microprinting techniques, ink jet techniques or electrospray techniques. As far as post-read out is concerned, with regard to the microprint techniques, reference is made to: "Microfabrication, Microstructures and Microsystems" by Dong Qin et al., "Topics in Current Chemistry," Volume 194, 1998, pp. 6 ff., Springer-Verlag. With regard to the ink jet techniques, reference is made, for example, to: "A new device for multifunctional dosage of liquids by a free jet" by N. Hey et al., Proceedings IEEE-Mems, 1998, CH 36176. Reference studies concerning electrospray techniques, particularly nanoelectric spray techniques, are, for example: "Analytical Properties of the

Nanoelectrospray Ion Sources" by M. Wilm and M. Mann in *Analytical Chemistry*, Volume 68, No. 1, January 1, 1996, pp. 1-8, as well as "Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?" by M. Wilm, M. Mann in *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 136 (1994), pp. 167-180. These techniques make it possible to provide the detection fields with predetermined binders in a targeted manner with high resolution of location. The binders can be applied to the external surface of the substrate disc. It is also conceivable, by analogy to the data pits of conventional CDs, to provide small recesses in the external surface of the substrate, and to immobilize the analyte-specific binders therein. If such recesses for the binders are provided, it will be advantageous to form them so they have a radial width of approximately 0.5 μm , corresponding to the width of the data pits of conventional CDs.

To examine biological interactions at the molecular level, the analytes that are considered, in particular, are nucleic acids and/or proteins. Thus, the method according to the invention can be used to detect protein/protein interactions, such as, for example, those which occur in gene expression or as cell signals, enzyme/substrate or enzyme/effect interactions during the metabolism, or protein/DNA or protein/RNA interactions during gene expression.

By means of an appropriate choice of the binders in the detection fields, DNA/DNA interactions can also be detected, which is of particular significance in gene identification and in the mapping of genes, in the examinations and quantification of gene expression, as well as in molecular diagnosis and/or therapy of diseases.

Molecular interactions and enzyme activities can be influenced by the formation of RNA aptamers and small chemical bonds to macromolecules. Natural and synthetic effector molecules therefore frequently allow the manipulation of biochemical processes by modulating, or intervening in, macromolecular interactions.

The substrate material preferably is a nonporous material. The use of a nonporous carrier allows the defined application of even small detection fields, so that a miniaturization of the test format or the application of a multitude of detection fields is possible. Suitable materials for the disc-shaped substrate are, for example, plastics and glass. For CD-ROM drive applications the preferred material is a focusing material, particularly a polycarbonate.

The immobilization of the binders to the detection fields can be carried out by methods which in themselves are known. The immobilization strategy depends on the type of molecule to be immobilized and the given substrate. In general, binders can be bound directly to a matrix by a chemical reaction, for example, via a specific amino acid in a protein (particularly cysteine lysine) or via the phosphate backbone of a DNA molecule. The immobilization can also be carried out with bifunctional chemical crosslinking agents or via a specific interaction with high affinity, such as the biotin/streptavidin interaction. The analyte-specific binders can also be adsorbed to the surface, where, however, a covalent bond is preferred. As binders, substances

and/or molecules are applied to the surface of the substrate which are capable of binding the desired analyte specifically, and, in particular, with high affinity.

After contacting the sample with the detection fields, the presence and/or quantity of the analyte to be detected is determined by optical evaluation of the detection fields. In this context, all the methods known to a person skilled in the art can be used. A conventional method for the analysis of molecular interactions consists of several steps: a first interaction partner, for example, an analyte-specific binder or receptor is linked covalently or adsorptively to a solid support. At the time of the contacting of the sample with the detection fields, a second interaction partner, for example, the analyte, can interact with the receptor. Then, the presence of the analyte (or the absence in competitive test formats) at the location where the receptor is immobilized is detected. The interaction between the two binders is preferably carried out under conditions where both reactants are present in a native, active configuration, preferably in a liquid reaction. It is particularly preferred to carry out the contacting at a pH which is close to the physiological pH and under ionic conditions.

In the method according to the invention the detection is carried out by detecting a change in the optical properties of the detection fields. The optical change in the detection field can be caused, for example, by isotopes, enzymes, fluorochromes, dyes, metal colloids, beads or similar materials which serve as the labeled system. For the detection, one of the interaction partners, for example, the receptor or the analyte, is labelled directly or indirectly. It is preferred to derivatize, for the detection, proteins or nucleic acids with one biotin unit, which then allows identification via streptavidin conjugates.

It is preferred that the detection method results in the precipitation of a dye or the localization of a fluorochrome at the place of the molecular interaction or in the accretion of metal clusters with strong electromagnetic interaction. Latex beads or plastic beads can also be bound. Because of their refractive behavior and their curved (spherical) surface, they effect the scattering of the incident read-out light, which can be detected as a change in intensity. If the beads have appropriate dimensions, effects of destructive interference can be achieved.

The interacting molecules, that is the receptor and the analyte, can be detected either directly via specific binding sites, or indirectly, by being provided with a label which contains a specific binding site. Examples of such labels are epitopes for which known monoclonal antibodies exist, or a biotin group, which can combine with streptavidin. In addition, it is also possible to use direct specific binding of an antibody to the analyte. Antibodies and streptavidin are preferably conjugated with an enzyme to allow the evaluation of the detection fields. Examples of preferred enzymes are epoxidase, alkaline phosphatase and β -galactosidase. At the time of the addition of appropriate substrates, an enzymatic chromogenic reaction occurs, during which colored products are formed which precipitate at those places where the enzymes are

bound and thus indicate the presence of the analyte. Suitable substrates of the above enzymes which allow an optical evaluation are, in the case of horseradish peroxidase, for example, diaminobenzidine (DAB), which produces a brown product which is insoluble in water and ethanol, DAB + metal, which results in a gray to black insoluble product, in the presence of cobalt or nickel, chlornaphthol, which produces a blue-black water-insoluble coloration, or aminoethyl carbazole, which produces a red water-insoluble product. Preferred substrates for alkaline phosphatase are naphthol-AS-BI-phosphate/new fuchsin, which produces a red insoluble product, bromochlorindolyl phosphate/nitrotetrazolium, which produces a black-violet precipitate, and β -galactosidase bromochlorindolyl-b-D-galactopyranoside (BCIG), which produces an insoluble blue product. The detection of the analytes can here easily be carried out by optical detection of the colored area.

An additional possibility for the detection of the sites of interaction is the technique of staining with gold colloids, a technique for which other types of metal clusters or beads can also be used. Silver particles are particularly advantageous in this context, if they are capable of increasing the sensitivity of an optical detection system based on nonlinear optical effects near a metal surface of the reflecting layer. Furthermore, it is preferred to use dyes as labels, particularly dyed latex particles. Glass beads made of silicon oxide which are filled with a dye at high concentration can also be used.

In addition to the measurement of the absorption, in the case where suitable labels are chosen, for example, fluorescing substances, it is also possible to measure the fluorescence where, in this case, the detection wavelength is different from the irradiated wavelength. To the extent that commercial CD drives, particularly CD-ROM drives, are to be used for the evaluation, it may be necessary, in the case of fluorescence measurements, to make changes in the construction of the drive, in addition to the corresponding adaptation of the software. In particular, it can be necessary to incorporate a detector which is specifically tuned to the fluorescence wavelength.

The invention makes it possible to record additional information on the planar face of the substrate which carries the detection fields, which information can be read and evaluated simultaneously with the detection fields. Accordingly, it is proposed to form additional data fields along the spiral line or at least one circular line of the planar face of the substrate which carries the detection fields, which data fields contain information pertaining to the sample and/or detection field and/or evaluation. In the case of information on the sample, the information can pertain, for example, to the place and time of the collection of the sample, the type of sample, or the individuals from whom the sample was collected. Information concerning the detection field can contain biomolecular or biochemical data on the detection fields, particularly on the binder type of the individual detection fields. The information pertaining to the evaluation can be data

concerning the detection principle used for the detection of the analytes, for example, enzymatic detection, detection via dyes, or detection via metal clusters or similar materials. Furthermore, they can contain data indicating which physical scanning principle a reading device is to use, for example, absorption measurement or fluorescence measurement. In addition, the information pertaining to the evaluation can give to the reading device the position and place of the detection fields on the substrate, and thus it can notify the reading device of the time when it should change from software for reading data fields to software for reading detection fields. In particular, it is conceivable that the information pertaining to evaluation already contains at least parts of an evaluation software, which is retrieved by the reading device at the time of the evaluation of the detection fields. In this manner, the user does not need to carry out laborious programming tasks to adapt the software of his/her computer workplace. The entire evaluation software can already be recorded in the sensor by the manufacturer, to the extent that appropriate software standards exist.

In addition it is conceivable to arrange the detection fields and the data fields separately along the spiral line. However, it can also be advantageous to arrange the detection fields and data fields alternately along the spiral line, for example, in such a manner that an individual detection field or a group of detection fields is associated with a data field which precedes the detection field or group of detection fields along the spiral line and which provides the evaluation system with information on this detection field or this group of detection fields.

To the extent that the detection fields are arranged along concentric circular lines, detection fields and data fields can also be arranged alternately along at least one circular line. It is also conceivable to form detection fields and data fields in each case on separate circular lines.

The data fields should advantageously be read from the same side of the substrate disc as the detection fields. This makes it possible to form recesses in the planar face of the substrate which carries the detection fields for the formation of the data fields, where the reflector is applied in such a manner that it penetrates into the recess. Advantageously, the coding of the data and the arrangement of the recesses meet the specifications of a standard CD format, particularly CD-ROM format, so that the data fields can be read by conventional CD drives without software modifications.

It is even conceivable to omit recesses for the formation of the data fields. By binding optically absorbing or scattering substances to the substrate it is also possible to influence the reflection of the light beam which is directed on the detection and data fields for the reading process. Thus, it is conceivable, with an appropriate choice of metal and plastic beads, to achieve similar effects of destructive interference to those which are also achieved by recesses in the substrate surface. Therefore, it is possible to apply, for the formation of the data fields, a

substance which influences incident reading light on the planar face of the substrate which carries the detection fields.

Because in the case of the formation of the reflector as a reflecting layer which is applied to the substrate the latter is applied only after the completion of all biomolecular or biochemical analysis steps, it is not possible to carry out before-after measurements of the detection fields, that is measurements before and after contacting the sample with the detection fields. However, in order to be nevertheless capable of obtaining reliable information from the measurement signals concerning the presence of analytes on detection fields and analyte identification, it can be advantageous to form, in addition, at least one reference field along the spiral line or along at least one circular line of the planar face of the substrate which carries the detection fields, where the reference field has optical properties which are used as reference in the evaluation of the detection fields. For example, these reference fields can have a known reference absorption level for the light of the scanning light beam, which level is typical for analyte-free detection fields, and which is distinguishable from the absorption level which detection fields typically have if analytes adhere to them. In addition, reference fields can also be formed which contain the analyte and/or labeler, and which function as a positive control in the correct use of the method. The reference fields can, moreover, be used for the calibration and for the quantification of the measurements.

In the area of the detection field, there may be a decrease in the adhesion of the reflecting layer, if the latter is immediately applied to the biomolecular or biochemical plane which lies below it. In this case, it can be advantageous, after contacting the sample with the detection fields, to first apply a coating layer made of an optically transparent material onto the detection fields, before the application of the reflecting layer. The coating layer can also be used for the fixation of the reagents in the detection fields. The material and the thickness of the coating layer must be adjusted to each other in such a manner that there is no influence on the optical properties of the sensor caused by the coating layer, for example, as a result of focusing or absorption effects, or, at least, so that any influence occurs in a manner which can be controlled. A polymer-based material has been shown to be best suited for the coating layer. Thus, for example, it can be applied as a film or by a spraying method. To the extent that the sensor also has recesses in the data fields, one must ensure that the recesses are not again filled by the material of the coating layer, to avoid a loss of data information represented by the recesses. It is conceivable to use spraying methods for the local application of the coating layer. It is also conceivable to carry out a fictitious subdivision of the surface of the substrate disc into segments, for example, sectors, of which a portion is exclusively reserved for detection fields and another portion exclusively for data fields. The segments with data fields can then easily be kept free of the coating layer.

The substrate with the binders immobilized on it can be packaged as a unit which can be handled and sent to the user. It is conceivable that the manufacturer could compile a customer-specific set of binders and apply it to the substrate. It is also conceivable to apply a set of binders to a substrate in a manner which is not specific to a customer, but specific to an application, for example, for certain gene analyses, and to offer this substrate as a prepared support. It is recommended to dry this support before packaging and shipping it. The sample to be examined is then applied by the user, that is by the purchaser of the support. The same can also apply to reagents which contain labels. The application of the reflecting layer and optionally the coating layer after completion of the biomolecular or biochemical detection method, which can also comprise washing steps, can be carried out by the user, provided he/she has appropriate equipment for this purpose. It is also conceivable that the user sends back the support with adhering analyte to the manufacture, or another laboratory, where these layers are applied.

It is also possible to apply a planar protective layer to the reflecting layer, for which protective layer an acrylate-based material is suitable because of its notch and scratch resistance. The support which has been protected in this manner can be stored for long periods and it can be read again at any time.

Furthermore, the invention relates to a support for the detection of analytes in a sample which is particularly suitable for carrying out the above-explained method.

According to another aspect, to solve the problem posed above, the invention starts with the method for the detection of analytes in a sample, in which analyte-specific binders are immobilized in a multitude of detection fields on at least one of the planar faces of a disc-shaped substrate, followed by contacting the sample with the detection fields, and then a determination of the presence and/or quantity of the analyte to be detected by the evaluation of the detection fields. According to the invention, provisions are made here for the magnetic evaluation of the detection fields, and for that purpose, binders, or the analytes to be detected, are labelled with magnetic and/or magnetizable labels, with the provision that the detection fields are arranged along a multitude of concentric circular lines and/or along at least one spiral line, distributed on the substrate.

The circle- or spiral-shaped distribution of the detection fields on the substrate allows the use of a commercial magnetic disc reading device, so-called hard disc drives. Optionally, an adaptation of the software of the drive control is required. The magnetic reading of the detection fields even allows the formation of detection fields on both planar faces of the substrate, resulting in the possibility of considerably increasing the packing density of the sensors with detection fields. With regard to the mutual separations, the sizes and the arrangement of the detection fields, as well as of any data and reference fields on the substrate, the comments made above for the optically readable sensor essentially apply.

In order to prevent the labeler from being torn off as a result of contact with the reading head of the evaluation device from the substrate, a fixation layer can be applied onto the detection fields after contacting the sample with the detection field. The fixation layer should advantageously be flatly applied on each planar face of the substrate which carries detection fields. Polymer-based materials have been shown to be suitable for the fixation layer.

In addition, prior to the formation of the detection field or after contacting the sample with the detection fields, a magnetic and/or magnetizable particle containing magnetic layer can be flatly applied on each planar face of the substrate which carries detection fields. The magnetic layer makes it possible to record additional data in the sensor, which can be read together with the detection fields. The magnetic properties of the magnetic layer must be chosen in such a manner that the local oscillations in the magnetic field strength or the magnetic flux density caused by the labels do not become "blurred" as a result of the magnetic layer, and thus become undetectable. Although, in principle, it is conceivable that the magnetic layer is applied, below the biomolecular or biochemical layer of the sensor, immediately on the substrate, it is nevertheless advantageous to apply it only after the completion of the biomolecular or biochemical process steps, because it can simultaneously serve as fixation layer.

Furthermore, the invention relates to a test kit for use with the method according to the above-described first and second aspect. The test kit comprises here a support which has been prepared with immobilized binders, as well as reagents for use with the detection method, in particular optical and/or magnetically detectable detection reagents, as well as, optionally, washing and/or buffer solutions. The support is preferably in the dried form.

Finally, the invention relates to the use of a support of the above described type in an immunoassay and/or nucleic acid hybridization assay and/or lectin-sugar assay and/or protein-nucleic acid assay.

The invention is further explained below with reference to the drawings in the appendix. In the drawings:

Figure 1 represents a schematic cross section of a biomolecular or biochemical sensor according to the invention ("biosensor") with detection and data fields, and

Figure 2 schematically represents the distribution of the detection and data fields on the biosensor.

In Figure 1, which does not exactly reproduce the real size ratios, the biosensor overall bears the reference numeral 1. It is in the shape of a circular disc. Advantageously, its size corresponds to that of a conventional compact disc, whose diameter is usually approximately 12 cm. The biosensor 1 comprises a carrier substrate 3 which is prepared from an optically transparent material, preferably polycarbonate. On the top planar face of substrate 3 in Figure 1, detection field 5, 7 and data fields 9 are formed. In the data fields 9, information concerning the

sample and/or the detection fields and/or the evaluation is stored. As in conventional CDs, the information in the data fields 9 is represented by alternating areas 11 with increased depth and areas 13 without increased depth of the substrate 3.

In the detection fields 5, 7, analyte-specific binders or receptors are immobilized. These binders are schematically represented in Figure 1 by short lines 15. Each detection field 5, 7 carries a multitude of binders 15 of the same or different type. The detection field 7, in Figure 1, represents a detection field to which no analytes have become bound after contacting the sample with the detection fields 5, 7. In contrast, the detection field 5 represents a detection field in which the analytes remain bound. These analytes are schematically represented in Figure 1 by a small circle 17, which simultaneously symbolizes the labels, by means of which the optical detection of the presence of the analytes is possible.

The detection fields 5, 7 are embedded in a coating layer 19, which is only applied in the areas of the substrate 3 which carry the detection fields 5, 7, but not in the areas of the substrate 3 which carry the data fields 9. The coating layer 19 also consists of an optically transparent material, preferably a polymer material. It fixes the labeler to the substrate 3 and at the same time it functions as an adhesive between the substrate 3 and the reflecting layer 21, which is applied in a planar manner on the substrate 3, over all detection fields 5, 7 and all data fields 9, and which extends into the recesses 11 of the data fields 9. The reflecting layer 21 preferably is made of aluminum, but it can also be made of silver, for example, and it is advantageously produced by chemical vapor phase deposition. The reflecting layer 21 serves as a reflector for the light of a laser beam 23, which is directed from the bottom side of the substrate 3 onto the biosensor 1 for reading the detection fields 5, 7 and the data fields 9. The reflected light is evaluated using routine methods. For example, the light is separated by means of a polarization filter from the irradiated light, and then evaluated to determine its intensity. The material of the substrate 3 advantageously has a refractive index such that the laser beam 23 is focused on its entry path in the substrate 3, so that the light spot which in the end falls onto the detection fields 5, 7 and the data fields 9 can be kept very small.

Toward the top side, the biosensor 1 is closed off by a coating layer 25, which is applied in a planar manner, and which protects the biosensor 1 from harmful chemical or mechanical influences. Advantageously, it is made of an acrylate material.

The detection fields 5, 7 and the data fields 9 are arranged in an alternating sequence along a spiral line on the substrate 3. Figure 2 shows a detail of two successive windings of the spiral line. The latter is represented in Figure 2 as a broken line, and it bears the reference numeral 27. Furthermore, d denotes the radial separation between the two windings, that is the pitch of the spiral. It is, for example, approximately $1.6\text{ }\mu\text{m}$. The recesses 11, which, in the case of the coding which is routinely used for CDs, particularly CD-ROMs, can have a gradually

varying circumferential length, have, for example, a width of approximately 0.5 μm in the radial direction. To prevent radial overlapping with detection and data fields of adjacent spiral windings, the detection fields 5, 7 are also formed radially so small that there is a sufficient separation from the fields of the adjacent spiral windings. In particular, the detection fields 5, 7 can also be approximately 0.5 mm wide. In the case of such dimensions, one can without any problem tolerate the "fraying" which is frequently observed in the case of the enzymatic detection of analytes adhering in the detection fields 5. In the circumferential direction, the detection fields 5, 7 can be longitudinal, so that they can be formed with a sufficiently large total surface area. In the circumferential direction as well, the detection fields 5, 7 will be at a sufficient separation from each other and from the data fields 9.

The above-mentioned measures are particularly recommended if, for reading the data and detection fields, CD drives with a spot diameter of the laser beam 23 of approximately 2 μm are used.

Below, some biomolecular or biochemical application examples of the invention are explained.

Example 1

Applications

The applications can be classified depending on the type of the immobilized binding partner (A) of the analyte-specific binder, and the type of its "ligand," that is the analyte (B). It is preferred to use nucleic acids and/or proteins as interaction partners, however, other partners of specific binding pairs can also be used, such as lectins or sugars.

It is preferred to derivatize the receptors or analytes, particularly proteins and nucleic acids, with a biotin group, where the biotin group is then advantageously detected with a streptavidin enzyme conjugate, such as horseradish peroxidase. The substrate of the enzyme reaction is chosen in such a manner that an intense dark precipitate forms at the place of the molecular interaction, which quenches the detection laser. In addition, the detection can also be carried out by direct derivatization of an interaction partner with a fluorochrome in combination with an appropriate laser.

Example 1.1

The receptor (A) is an RNA aptamer, a peptide or a natural or synthetic effector molecule, and the analyte (B) is a protein.

The properties of an enzyme or a regulation factor in gene expression are frequently modulated by the association of small effect or ligand molecules. Examples are hormone receptors, which are converted after the binding to the hormone into an active conformation. The protein function can be modulated by the interaction of a substrate analog or by allosteric effectors. To identify suitable small chemicals, screening processes for ligands are carried out, with the examination of a large number of different chemicals.

According to the method of the invention it is possible to completely test chemical libraries. In this process, a multitude of different small chemicals is immobilized in a defined order on the support, where the protein in question is contacted with the support under different stringency conditions. Bound protein is detected directly, if it is labelled with an appropriate fluorochrome, for example, a latex particle, or indirectly using an enzyme amplification cascade. In a corresponding manner, large libraries of RNA aptamers or peptides can be screened, either separately or bound in a fusion protein, to determine interactions with a protein in question.

Example 1.2

The receptor (A) is a protein, and the analyte (B) is a nucleic acid or a ligand.

Protein libraries can be screened with respect to certain binding properties, for example, the interaction with a defined DNA sequence. Replicated supports which contain defined areas of proteins, which together represent the products of a cDNA expression library, can be characterized with specific ligands or DNA binding sites. The arranged proteins can thus be unknown proteins, as in the library, and identified only by the method according to the invention. Alternately, areas of known proteins or derivatives of a defined protein, such as the product of a random mutagenesis, can be examined.

Example 1.3

The receptor (A) is DNA or RNA, and the analyte (B) is a protein.

A large number of different double-stranded DNA fragments can be applied to the detection fields. In this context, the fragments can either be small fragments, for example, oligonucleotides, or larger DNA fragments to very large DNA fragments which represent an ordered library of genomic DNA fragments. The applications comprise the systematic search for possible genomic binding sites for DNA binding proteins, but also other DNA binding molecules can be detected, such as intercalators, small molecules with a preselection for certain sequences, PNAs and sequences which form a triple helix. Similarly, RNA molecules can be applied as

receptor molecules in the detection fields, such as transcripts of a cDNA library or the derivatives of a defined RNA, such as the product of a random mutagenesis.

Example 2

Nucleic acid examinations

The receptor (A) is single-stranded DNA, and the analyte (B) is single-stranded DNA or RNA.

Example 2.1

DNA mapping

In the meantime it has become possible to sequence entire genomes, and the genomes of higher eukaryotes, such as humans, mice and fleas, are mapped and covered by ordered clones (such as P1 phage clones), where the assumption is that the sequences of all genomes will be available in the foreseeable future. In this context, supports according to the invention can be prepared which contain entire genomes in ordered arrays or areas. Thus, it is possible to assign a cloned piece of DNA in a single hybridization step to its genomic location and, independently of the resolution of the array (which is a function of the mean sequence length and the number of individual DNA molecules), even to identify the gene itself. Examples of such an application are the P1 arrays of Genome Systems, which so far had been difficult to screen, because they were only available on membranes. The application of this P1 array onto supports according to the invention allows a simple and uncomplicated use; translocations and other genomic rearrangements, which are frequently the cause of genetic diseases, can also be mapped in a simple way, including deletions of the mitochondrial genome. In addition, inserts of transgenes can easily be mapped if the inserted DNA is detected together with a small quantity of flanking genomic DNA.

Example 2.2

Gene identification and/or gene cloning

Arrays or areas of diagnostic oligonucleotides, which represent all known genes of a given species, allow the direct identification of a gene in question. For this purpose one can improve, for example, cDNA arrays from Klontech or DNA chips from Affimetrix, on which all the yeast genes are applied, by a transfer to the support according to the invention.

Example 2.3

Expression profile examinations

By the application of DNA representing all the genes of an organism on supports according to the invention, the expression profile can be examined. A complex mixture of RNA is applied on the support which represents the expression state of a certain cell or of a cDNA population derived therefrom. The expression state determined on the support can easily be compared with the expression state of other cells which originate from other tissues, other developmental stages or other metabolic states. Alternately, DNA samples can be examined which represent certain chosen DNA states, such as cell cycle genes, signal transmission components, etc. Because the supports according to the invention can be stored over a long time period, expression profiles can be prepared which can be archived and used for comparative purposes.

Example 2.4

Molecular diagnosis of DNA polymorphisms

The method according to the invention can be used for the diagnosis of common or rare DNA polymorphisms, including the mapping of mutations in protooncogenes, which cause common tumors. An appropriate support contains overlapping oligonucleotides which together comprise a complete gene (for example, the wild type sequence), together with oligonucleotides which contain all possible or frequently occurring mutations of this sequence. The corresponding DNA fragment is isolated from patients by PCR and hybridized to the relevant gene support under conditions in which the hybridization only occurs if there is a perfect match between the sequences. A comparison of the hybridization of the experimental DNA to wild type or mutant oligonucleotides makes it possible to determine with precision what type of mutation occurs in a sequence.

Example 3

In addition to the applications described above, in which a simple binding process was demonstrated which produces signals which can optionally be amplified by an enzyme cascade to increase the sensitivity of the detection, the method according to the invention can also be used in applications which require more extensive treatments of the support, for example, PCR amplification, which is carried out analogously to in situ PCR amplifications. In this manner it is also possible to detect infectious agents.

Claims

1. Method for the detection of analytes in a sample, where analyte-specific binders (15) are immobilized in a multitude of detection fields (5, 7) located on one of the planar faces of a disc-shaped substrate (3), then the samples are contacted with the detection fields (5, 7), and subsequently the presence and/or the quantity of the analytes (17) to be detected is (are) determined by optical evaluation of the detection fields (5,7), characterized in that a substrate (3) prepared from an optically transparent material is used, in that the detection fields (5, 7) are arranged along at least one spiral line to (27) and/or a multitude of concentric circular lines on the substrate (3) and in that, after contacting the sample, an optical reflector (21) is arranged adjacently to the planar face of the substrate (3) which carries the detection fields (5, 7).

2. Method according to Claim 1, characterized in that the reflector is formed by a reflecting layer (21) which is applied to the substrate (3) over the detection fields (5, 7).

3. Method according to Claim 2, characterized in that the reflecting layer (21) is made of aluminum.

4. Method according to Claim 1, characterized in that the reflector is arranged with separation from the substrate.

5. Method according to one of Claims 1-4, characterized in that, with reference to the disc axis, radially adjacent detection fields (5, 7) are arranged with radial separation.

6. Method according to one of Claims 1-5, characterized in that, along the spiral line (27) or a circular line, adjacent detection fields (5, 7) are arranged with separation from each other.

7. Method according to one of Claims 1-6, characterized in that, on the planar face of the substrate (3), which carries the detection fields (5, 7) along the spiral line (27), or at least along one circular line, additional data fields (9) are formed which contain data pertaining to samples and/or detection fields and/or the evaluation.

8. Method according to Claim 7, characterized in that detection fields (5, 7) and data field (9) are arranged alternately along the spiral line (27) or along at least one circular line.

9. Method according to Claim 7, characterized in that detection fields and data fields are each formed on separate circular lines.

10. Method according to one of Claims 7-9, characterized in that for the formation of the data fields (9), recesses (11) are formed in the planar face of the substrate (3) which carries the detection fields (5, 7) and in that the reflector (21) is applied in such a manner that it reaches into the recesses (11).

11. Method according to one of Claims 7-9, characterized in that for the formation of the data fields, a substance which influences incident reading light is applied on the planar face of the substrate which carries the detection fields.

12. Method according to one of Claims 1-11, characterized in that, on the planar face of the substrate (3) which carries the detection fields (5, 7), along the spiral line (27) or along at least one circular line, at least one reference field is formed, in addition, whose optical properties are used as reference in the evaluation of the detection fields (5, 7).

13. Method according to one of Claims 1-12, characterized in that, after contacting the sample with the detection fields (5, 7), below the reflector, a coating layer (19) made of an optically transparent material is applied on the detection fields (5, 7).

14. Method according to Claim 13, characterized in that for the coating layer (19) a polymer-based material is used.

15. Method according to one of Claims 1-14, characterized in that a substrate (3) made of polycarbonate is used.

16. Method according to one of Claims 1-15, characterized in that the substrate (3) is provided at a manufacturing site with binders (15), dried and packaged, and in that the substrate (3) so prepared is then brought to an application site which is at a distance from the manufacturing site, at which application site the sample is contacted by a user with the detection fields (5, 7).

17. Method according to one of the preceding claims, characterized in that the detection of the analytes is carried out by a detection of a change in the optical properties of the detection fields.

18. Method according to Claim 17, characterized in that the optical change in the detection fields is caused by isotopes, enzymes, fluorochromes, dyes, metal colloids and/or beads.

19. Method according to Claim 18, characterized in that latex beads, plastic beads, glass beads and/or metal beads are used.

20. Support for the detection of analytes in a sample, in particular for using the method according to one of Claims 1-19, characterized by a disc-shaped substrate (3) made of an optically transparent material, to one of whose planar sites analyte-specific binders (15) are immobilized in a multitude of detection fields (5, 7), where the detection fields (5, 7) are arranged along at least one spiral line (27) and/or a multitude of concentric circular lines on the substrate (3).

21. Support according to Claim 20, characterized in that, over the detection fields (5, 7), a reflecting layer (21) is arranged, which, after contacting the sample with the detection fields (5, 7), is flatly applied on the substrate (3).

22. Support according to Claim 21, characterized in that a protective layer (25) is flatly applied on the reflecting layer (21).

23. Support according to Claim 22, characterized in that the protective layer (25) is made of an acrylate-based material.

24. Support according to Claims 20-23, characterized in that it is packaged as one commercial unit.

25. Support according to Claim 24, characterized in that it is packaged in the dry state.

26. Method for the detection of analytes in a sample, in which analyte-specific binders are immobilized in a multitude of detection fields on at least one of the planar faces of a disc-shaped substrate, then the sample is contacted with the measurement fields, and subsequently the presence and/or the quantity of the analytes to be determined is (are) determined by evaluation of the detection fields, characterized in that the detection fields are magnetically evaluated and, for that purpose, binders, or the analytes to be detected, are labelled with magnetic and/or magnetizable labels and in that the detection fields are arranged along a multitude of concentric circular lines and/or along at least one spiral line on the substrate, if desired in connection with other characteristics of at least one of Claims 1-25.

27. Method according to Claim 26, characterized in that, after contacting the sample with the detection fields, a fixation layer is applied to the detection fields.

28. Method according to Claim 27, characterized in that the fixation layer is flatly applied on each planar face of the substrate which carries detection fields.

29. Method according to Claim 28 or 29, characterized in that, for the fixation layer, a polymer-based material is used.

30. Method according to one of Claims 26-29, characterized in that, for the formation of the detection fields and after contacting the sample with the detection fields, a magnetic layer, which contains magnetic and/or magnetizable particles, is flatly applied on each planar face of the substrate which carries detection fields.

31. Test kit for use with the method according to one of Claims 1-19 and 26-30, comprising
a) a support (3) prepared with immobilized binders (15),

b) reagents for use with the detection method, in particular detection reagents which can be detected optically and/or magnetically, and

c) optionally washing solutions and/or buffer solutions.

32. Test kit according to Claim 31,
characterized in that the support (3) is in a dried form.

33. Use of a support according to one of Claims 20-25 in a immunoassay and/or nucleic acid hybridization assay and/or lectin-sugar assay and/or protein-nucleic acid assay.

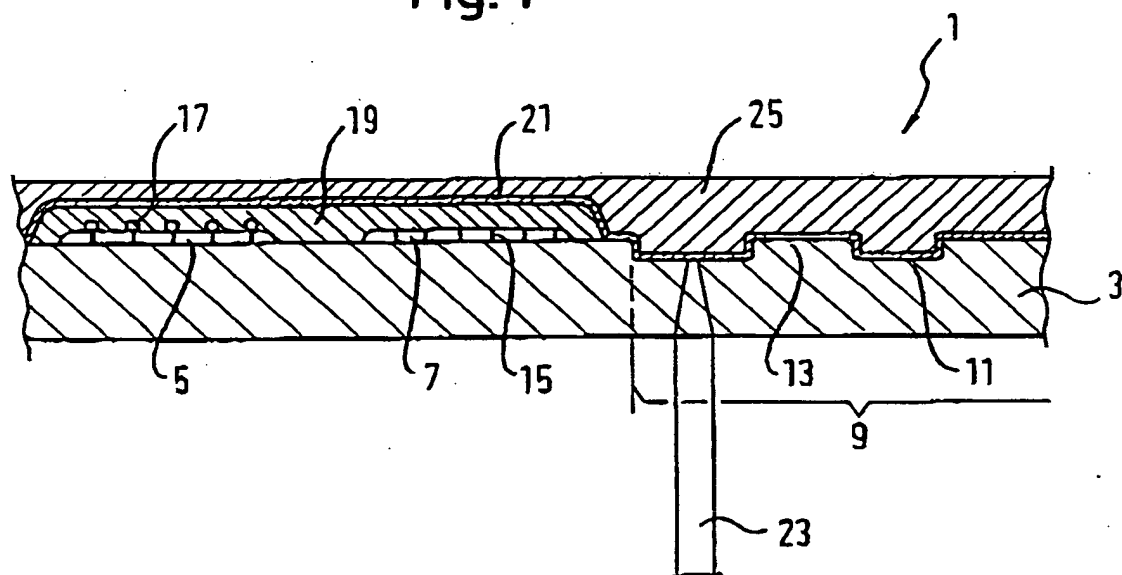
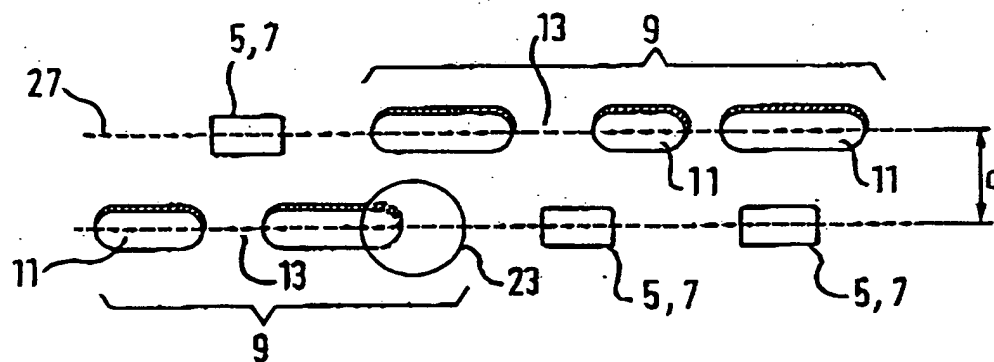


Fig. 2



International Application No
CT/EP 00/00876

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ✓	<p>WO 96 09548 A (GORDON JOHN FRANCIS ;UNIV DUNDEE (GB)) 28 March 1996 (1996-03-28)</p> <p>page 2, line 22 -page 3, line 2 page 6, line 18 -page 7, line 13 page 7, line 17-23 page 10, line 16 -page 11, line 20 page 12, line 7-13 page 14, line 5-18 page 8, line 15-19 figures 1-3</p> <p style="text-align: center;">— —/—</p>	<p>1,4-10, 12,17, 18,20, 31-33</p> <p>26</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * "document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance"
- * "earlier documents but published on or after the international filing date"
- * "document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)"
- * "document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means"
- * "document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed"

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2000

Date of mailing of the international search report

20. 10. 00

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Goetz, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT



International Application No.

PCT/EP 00/00876

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ✓	<p>WO 98 12559 A (DEMERS JAMES P) 26 March 1998 (1998-03-26)</p> <p>page 5, last paragraph -page 6, paragraph 2 page 7, paragraph 2 page 7, last paragraph page 8, last paragraph -page 9, paragraph 1 page 15, paragraph 2 -page 16, paragraph 2 page 17, last paragraph -page 21, paragraph 1</p>	<p>1,5-10, 17,18, 20,31-33</p>
Y		26
X ✓	<p>WO 98 01533 A (BURSTEIN LAB INC) 15 January 1998 (1998-01-15)</p> <p>page 9, line 15-37 page 10, line 32-37 page 20, line 27 -page 26, line 16 page 32, line 17-27 page 52, line 18 -page 54, line 7 page 62, line 31-34 claims 18-26,31,33</p>	<p>20, 26-29, 31-33</p>
Y ✓	<p>WO 96 05326 A (FOX JOHN S) 22 February 1996 (1996-02-22) page 4, line 1 -page 5, line 7 claims 1-18; figure 1</p>	26
A ✓	<p>T. SCHALKHAMMER: "Metal nano clusters as transducers for bioaffinity interactions" MONTASHEFTE FÜR CHEMIE/CHEMICAL MONTHLY, vol. 129, no. 10, 1998, pages 1067-1092, XP000917114 abstract</p>	1-25

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 19503P WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/00876	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/02/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 03/02/1999
Anmelder EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (E		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1 - 25,
31 - 32 (sofern auf Ansprüche 1 - 19 bezogen), 33

- Verfahren zum Nachweis von Analyten mittels eines scheibenförmigen Substrates mit immobilisierten analytspezifischen Bindern in einer Vielzahl von Nachweisfeldern, die in einer Spirallinie oder in konzentrischen Kreisen angeordnet sind, wobei nach dem Inkontaktbringen der Probe mit den Nachweisfeldern ein optischer Reflektor über den Nachweisfeldern angebracht wird
- Messträger zur Durchführung des Verfahrens
- Testkit, enthaltend einen geeigneten Messträger (sofern auf Ansprüche 1-19 bezogen)
- Verwendung des Testträgers

2. Ansprüche: 26 - 30,
31 - 32 (sofern auf Ansprüche 26 - 30 bezogen)

- Verfahren zum Nachweis von Analyten mittels eines scheibenförmigen Substrates mit immobilisierten analytspezifischen Bindern in einer Vielzahl von Nachweisfeldern, die in einer Spirallinie oder in konzentrischen Kreisen angeordnet sind, wobei die Nachweisfelder magnetisch ausgewertet werden.
- Testkit, enthaltend einen geeigneten Messträger (sofern auf Ansprüche 26-30 bezogen)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/551 G11B7/013

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N G11B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 09548 A (GORDON JOHN FRANCIS ;UNIV DUNDEE (GB)) 28. März 1996 (1996-03-28) Seite 2, Zeile 22 -Seite 3, Zeile 2 Seite 6, Zeile 18 -Seite 7, Zeile 13 Seite 7, Zeile 17-23 Seite 10, Zeile 16 -Seite 11, Zeile 20 Seite 12, Zeile 7-13 Seite 14, Zeile 5-18 Seite 8, Zeile 15-19 Abbildungen 1-3	1,4-10, 12,17, 18,20, 31-33
Y	--- -/--	26



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Oktober 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20.10.00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Goetz, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 98 12559 A (DEMERS JAMES P) 26. März 1998 (1998-03-26)</p> <p>Seite 5, letzter Absatz -Seite 6, Absatz 2 Seite 7, Absatz 2 Seite 7, letzter Absatz Seite 8, letzter Absatz -Seite 9, Absatz 1 Seite 15, Absatz 2 -Seite 16, Absatz 2 Seite 17, letzter Absatz -Seite 21, Absatz 1</p>	1,5-10, 17,18, 20,31-33
Y	----	26
X	<p>WO 98 01533 A (BURSTEIN LAB INC) 15. Januar 1998 (1998-01-15)</p> <p>Seite 9, Zeile 15-37 Seite 10, Zeile 32-37 Seite 20, Zeile 27 -Seite 26, Zeile 16 Seite 32, Zeile 17-27 Seite 52, Zeile 18 -Seite 54, Zeile 7 Seite 62, Zeile 31-34 Ansprüche 18-26,31,33</p>	20, 26-29, 31-33
Y	<p>WO 96 05326 A (FOX JOHN S) 22. Februar 1996 (1996-02-22) Seite 4, Zeile 1 -Seite 5, Zeile 7 Ansprüche 1-18; Abbildung 1</p>	26
A	<p>T. SCHALKHAMMER: "Metal nano clusters as transducers for bioaffinity interactions" MONTASHEFTE FÜR CHEMIE/CHEMICAL MONTHLY, Bd. 129, Nr. 10, 1998, Seiten 1067-1092, XP000917114 Zusammenfassung</p>	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00876

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9609548 A	28-03-1996	AU 714662 B	06-01-2000
		AU 3481595 A	09-04-1996
		BR 9509021 A	30-12-1997
		CA 2200562 A	28-03-1996
		CN 1158659 A	03-09-1997
		EP 0782705 A	09-07-1997
		JP 10504397 T	28-04-1998
		US 5892577 A	06-04-1999
WO 9812559 A	26-03-1998	AU 4428497 A	14-04-1998
WO 9801533 A	15-01-1998	AU 3958597 A	02-02-1998
		BR 9710702 A	11-01-2000
		CA 2260361 A	15-01-1998
		CN 1230216 A	29-09-1999
		EP 0918845 A	02-06-1999
WO 9605326 A	22-02-1996	AU 3330595 A	07-03-1996

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 17 MAY 2001

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 19503P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00876	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/02/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 03/02/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/543		
Anmelder EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARB....et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 35 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 07/07/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15.05.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Goetz, M Tel. Nr. +49 89 2399 8697 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-3,3a-3b,4-26 eingegangen am 23/03/2001 mit Schreiben vom 23/03/2001

Patentansprüche, Nr.:

1-27 eingegangen am 23/03/2001 mit Schreiben vom 23/03/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
☒ zusätzliche Gebühren entrichtet.
☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☒ erfüllt ist
☐ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.
☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00876

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1 - 27
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1 - 27
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1 - 27
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Art. 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Obwohl die Dokumente **D1 - D4** verschieden ausgestaltete Messträger im CD-Disk-Format für die immunologische Analyse sowie Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung beschreiben, siehe
 - **D1**, Fig. 1 - 3, Seite 2/Zeile 22 - Seite 3/Zeile 2, Seite 6/Zeile 18 - Seite 7/Zeile 13, Seite 7/Zeilen 17 - 23, Seite 10/Zeile 16 - Seite 11/Zeile 20, Seite 12/Zeilen 7 - 13 und Seite 14/Zeilen 5 - 18;
 - **D2**, Seite 5/letzter Absatz - Seite 6/2. Absatz, Seite 7/2. und letzter Absatz, Seite 8/letzter Absatz - Seite 9/1. Absatz, Seite 15/2. Absatz - Seite 16/2. Absatz, Seite 17/letzter Absatz - Seite 21/1. Absatz;
 - **D3**, Seite 9/Zeilen 15 - 37, Seite 10/Zeilen 32 - 37, Seite 20/Zeile 27 - Seite 26/Zeile 16, Seite 32/Zeilen 17 - 27, Seite 62/Zeilen 31 - 34, Ansprüche 18 - 26, 31 und 33;
 - **D4**, Fig. 1 und Seite 4/Zeile 1 - Seite 5/Zeile 7 und Ansprüche 1 - 18,

wird das Anbringen des Reflektors in Form einer Reflexionsschicht, die auf das Substrat (3) über den Nachweisfeldern (5,7) aufgebracht wird (Ansprüche 1 und 18) sowie das Aufbringen einer flächigen Magnetschicht (Anspruch 23) nach derzeitigem Kenntnisstand von keiner der zitierten Entgegenhaltungen offenbart oder nahegelegt.

2. Ansprüche 1 - 27 erfüllen daher die Voraussetzungen gemäss Art. 33(2)-(4) PCT.

- 1 -

Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe sowie Meßträger hierfür

5

Neue Beschreibung

10

Die Erfindung befaßt sich mit dem Nachweis von Analyten in einer Meßprobe. Als Analyten kommen beispielsweise Proteine, Peptide, Nukleinsäuren und deren Derivate sowie Moleküle, die an diesen binden können, in Frage.

15

Als Meßprobe kommt jede Probe in Frage, von der vermutet wird, daß sie mindestens einen Teil der gesuchten Analyten enthält. Es kann sich dabei z. B. um eine Blutprobe, eine Serumprobe oder/und eine Urinprobe handeln, oder allgemein um jede Lösung, die den gesuchten Analyten enthält.

20

25

Zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe ist der Einsatz sogenannter Bindungsassays bekannt. Bei solchen Bindungsassays werden im allgemeinen Analyten durch ihre spezifische Wechselwirkung mit Rezeptoren nachgewiesen. Beispiele für solche Wechselwirkungen sind Protein/Protein-Wechselwirkungen, die beispielsweise während der Genexpression auftreten, Enzym/Substrat- oder Enzym/Effektor-Wechselwirkungen, die im Stoffwechsel auftreten, oder Protein/DNA- oder Protein/RNA-Wechselwirkungen während der Genexpression. Ein systematisches Verständnis dieser molekularen Wechselwirkungen ist eine Grundvoraussetzung für das Verständnis aller biologischen Vorgänge sowohl in normalen als auch in erkrankten Zellen.

30

Weiterhin können mit Bindungsassays auch Nukleinsäuren nachgewiesen werden. DNA/DNA-Wechselwirkungen spielen eine Hauptrolle in der Molekularbiologie, insbesondere bei der Identifizierung von Genen und bei Strategien zur Kartierung von DNA, beim Nachweis und der Quantifizierung.

- 2 -

der Genexpression sowie bei der molekularen Diagnose oder Therapie von Erkrankungen. In Frage kommen selbstverständlich auch DNA/RNA- und RNA/RNA-Wechselwirkungen.

5 Aufgrund der großen Anzahl von Genen, Proteinen, chemischen Effektoren oder RNA-Aptameren erfordert ein Verstehen oder Eingreifen in biochemische Prozesse häufig die Erkennung, Quantifizierung oder Klassifizierung einer Vielzahl von molekularen Wechselwirkungen oder die Identifizierung von wirksamen Wechselwirkungspartnern aus einer großen Anzahl von
10 möglichen Kombinationen. Das Screening und Analysieren einer großen Anzahl von molekularen Wechselwirkungen ist bei den im Stand der Technik bekannten Verfahren jedoch häufig begrenzt.

Meßproben sollen oftmals auf eine Vielzahl von Analyten hin untersucht
15 werden. Dabei ergibt sich das Problem, daß bei der Auswertung große Datenmengen anfallen. Um in der Praxis erfolgreich zu bestehen, muß die Auswertung jedoch in vertretbarer Zeit möglich sein. Bekannte Analysesysteme haben sich hier als nur bedingt zufriedenstellend erwiesen.

20 Aus einem Artikel "Metal Nano Clusters as Transducers for Bioaffinity Interactions" von Thomas Schalkhammer in Monatshefte für Chemie 000, 1-26, Springer-Verlag 1998, Seiten 1-26, ist ein Sensoraufbau für biorekognitive Bindungsvorgänge und katalytisch-enzymatische Prozesse bekannt, bei dem auf einem Polycarbonat-Substrat eine Spiegelschicht aus Silber und
25 darüber eine Abstandsschicht aus einem Polymermaterial angeordnet sind. Die Abstandsschicht dient ihrerseits als Träger für die darauf immobilisierten Binder. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von Metall-Clustern, mit denen die nachzuweisenden Analyten markiert werden und die in elektromagnetische Wechselwirkung mit der metallischen Spiegelschicht treten. In Sensorberei-
30 chen starker Überdeckung mit gebundenen Metall-Clustern wird Licht, das von der dem Polycarbonat-Substrat abgewandten Seite der Spiegelschicht her eingestrahlt wird, stärker absorbiert als in überdeckungsfreien oder

- 3 -

schwächer überdeckten Sensorbereichen, was die optische Auslesung des Sensors über Absorptionsmessungen ermöglicht.

Für die Funktion dieses bekannten Sensors ist die Dicke der Abstandsschicht ein entscheidender Parameter. Diese muß in einem vorgegebenen Bereich gewählt werden, der von der Wellenlänge des bei der späteren Auswertung eingestrahlten Lichts abhängt. Es muß insbesondere sichergestellt sein, daß die Abstandsschicht auf ihrer gesamten Ausdehnung eine gleichmäßige Dicke besitzt. Hierfür ist ein hoher herstellungstechnischer Aufwand zu betreiben.

In dem angesprochenen Artikel werden für die optische Auswertung dieses Sensors schon Lesegeräte vorgeschlagen, die es erlauben, auch größere Datenmengen zu bewältigen, unter anderem CD-ROM-Lesegeräte.

~~Aufgabe der Erfindung ist es, einen Weg aufzuzeigen, wie mit geringem Aufwand, nicht nur was die datentechnische Auswertung anbelangt, sondern auch was die Bereitstellung des Sensors anbelangt, eine Meßprobe auf eine große Fülle von Analyten hin untersucht werden kann.~~

Bei der Lösung dieser Aufgabe geht die Erfindung nach einem ersten Aspekt von einem Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe aus, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch optische Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird.

Erfindungsgemäß ist hierbei vorgesehen, daß ein aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat verwendet wird, daß die ~~Nachweisfelder längs mindestens einer Spirallinie oder/und einer Vielzahl~~

3a

Aus WO96/09548 ist ein kreisscheibenförmiger Meßträger bekannt, auf dessen Oberfläche ein analytspezifischer Binder immobilisiert ist. Eingebaut in den Meßträger ist eine Reflexionsschicht; im übrigen besteht er aus einem optisch transparenten Material. Zum Nachweis von an den Bindern anhaftenden Analyten dient ein optisches Lesegerät, welches mit einem Laserstrahl die mit den Bindern versehene Oberfläche des Meßträgers spiralförmig abtastet.

Aus WO98/12559 ist ebenfalls ein kreisscheibenförmiger Meßträger bekannt, auf dessen Oberfläche analytspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert sind, welche längs Kreis- oder Spiralspuren verteilt sind. Die Nachweisfelder sind auf einer Substratschicht des Meßträgers angeordnet, auf dessen gegenüberliegender Seite sich eine Reflexionsschicht befindet. Zum Auslesen der Nachweisfelder dient wiederum ein Laserstrahl, der wie bei einem CD-ROM-Laufwerk die die Nachweisfelder tragende Seite des Meßträgers abtastet.

Aus WO98/01533 ist es zudem bekannt, in Nachweisfeldern auf einem kreisscheibenförmigen Meßträger befindliche Bindemoleküle mit magnetischen Markern zu markieren und die Nachweisfelder mittels eines magnetischen Leseverfahrens auszuwerten.

- 36 -

~~schwächer überdeckten Sensorbereichen, was die optische Auswertung des Sensors über Absorptionsmessungen ermöglicht.~~

Für die Funktion dieses bekannten Sensors ist die Dicke der Abstandsschicht ein entscheidender Parameter. Diese muß in einem vorgegebenen Bereich gewählt werden, der von der Wellenlänge des bei der späteren Auswertung eingestrahlten Lichts abhängt. Es muß insbesondere sichergestellt sein, daß die Abstandsschicht auf ihrer gesamten Ausdehnung eine gleichmäßige Dicke besitzt. Hierfür ist ein hoher herstellungstechnischer Aufwand zu betreiben.

In dem angesprochenen Artikel werden für die optische Auswertung dieses Sensors schon Lesegeräte vorgeschlagen, die es erlauben, auch größere Datenmengen zu bewältigen, unter anderem CD-ROM-Lesegeräte.

Aufgabe der Erfindung ist es, einen Weg aufzuzeigen, wie mit geringem Aufwand, nicht nur was die datentechnische Auswertung anbelangt, sondern auch was die Bereitstellung des Sensors anbelangt, eine Meßprobe auf eine große Fülle von Analyten hin untersucht werden kann.

Zus ist erfindungsgemäß ein Verfahren
Bei der Lösung dieser Aufgabe geht die Erfindung nach einem ersten Aspekt *gemäß Anspruch 1 vorgesehen.*
~~Von einem Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe aus bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch optische Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird.~~

Erfindungsgemäß ist hierbei vorgesehen, daß ein aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat verwendet wird, daß die ~~Nachweisfelder längs mindestens einer Spirallinie oder/und einer Vielzahl~~

- 4 -

~~konzentrischer Kreislinien verteilt auf dem Substrat angeordnet werden und daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern ein optischer Reflektor der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats benachbart angeordnet wird.~~

5

Bei der Erfindung können die Nachweisfelder direkt auf dem Substrat ausgebildet werden. Hierbei kann es sich empfehlen, die Substratoberfläche zunächst chemisch vorzubehandeln oder durch Vorbehandlung mit einem Sauerstoffplasma eine Oberflächenmodifizierung zu bewirken. Diese
10 Modifikation kann das Aufbringen der Binder zur Ausbildung der analyt-spezifischen Nachweisfelder erleichtern. Unterhalb der Binder ist bei der Erfindung demnach keine Abstandsschicht mit einer präzise einzuhaltenden Dicke auf das Substrat aufzubringen, wie dies bei dem von Schalkhammer bekannten Sensor zwingend erforderlich ist. Insofern ergibt sich ein
15 reduzierter fertigungstechnischer Aufwand.

Die Reflexionsschicht

~~Der Reflektor~~ wird für die optische Auswertung des Assays benötigt. *Sie wird*
~~kann von einer Reflexionsschicht gebildet werden, die nach Abschluß der~~
20 ~~Nachweisfeldern aufgebracht wird.~~ Aufgrund ihres guten Reflexionsvermögens empfehlen sich metallische Werkstoffe. Grundsätzlich sind auch andere Materialien denkbar, etwa Dielektrika. Bevorzugt wird die Reflexionsschicht aus Aluminium gebildet. Denkbar ist auch Silber als Material für die Reflexionsschicht. Die Reflexionsschicht kann durch chemisches Auf-
25 dampfen ausgebildet werden. Möglich ist aber auch, eine vorgefertigte reflektierende Folie auf das Substrat aufzukleben.

~~Alternativ ist es denkbar, daß der Reflektor im Abstand von dem Substrat angeordnet wird, er also nicht direkt auf das Substrat aufgebracht wird.~~
30 Beispielsweise kann der Reflektor von einer Spiegelplatte gebildet sein, die in einem Auswertegerät angebracht ist, welches zur Auswertung des Assays verwendet wird.

- 5 -

Die optische Transparenz des Substrats macht es zusammen mit dem auf der substratfernen Seite der Nachweisfelder angeordneten Reflektor^{Reflexionsschicht} möglich, zur optischen Auswertung dieses erfindungsgemäßen molekularbiologischen Sensors auf die Hardware handelsüblicher CD-Lesegeräte zurückzugreifen. Insbesondere bei spiraliger Anordnung der Nachweisfelder und bei Ausbildung des Reflektors als direkt auf das Substrat aufgetragene Reflexionsschicht können solche handelsüblichen CD-Lesegeräte mit vergleichsweise geringem Aufwand so modifiziert werden, daß aus dem rückkehrenden Licht des die Nachweisfelder abtastenden Laserstrahls die gewünschten Informationen herausgefiltert werden können. Denkbar ist es, daß hierzu lediglich Software-Modifikationen erforderlich sind. Selbst bei kreisförmiger Anordnung der Nachweisfelder ist die Technik solcher CD-Lesegeräte grundsätzlich anwendbar, sofern die konstruktiven und softwaremäßigen Voraussetzungen für einen Sprung des die Nachweisfelder abtastenden Laserstrahls von Kreislinie zu Kreislinie geschaffen werden.

Besonders eignet sich ein CD-ROM-Lesegerät, das bei Einbettung in eine Computerarchitektur dem Anwender die Möglichkeit gibt, die Auswertesoftware selbst zu definieren.

20

Die Auswertung der Nachweisfelder kann abhängig vom gewählten Auswertalgorithmus quantitative wie auch qualitative Aussagen liefern. Mittels geeigneter Marker können die optischen Eigenschaften, insbesondere das Absorptionsverhalten, von Nachweisfeldern, in denen sich Analyten an Rezeptoren angeheftet haben, von Nachweisfeldern, an deren Rezeptoren sich keine Analyten angeheftet haben, unterscheidbar gemacht werden. Auf diese Weise ist es beispielsweise über Absorptionsmessungen möglich, diejenigen Nachweisfelder zu erkennen, die nach Abschluß der molekularbiologischen Verfahrensschritte Analyten tragen. Dies wäre zunächst eine rein qualitative Aussage. Will man darüber hinaus auch quantitative Aussagen treffen, so ist es denkbar, die Nachweisfelder mehrmals abzutasten und eine Schwelle, die bei der Auswertung als Entscheidungsgrenze zwischen

30

- 6 -

Vorhandensein und Nichtvorhandensein von Analyten genommen wird, von Abtastdurchgang zu Abtastdurchgang schrittweise zu verändern. Auf diese Weise können auch Aussagen über die Menge der in den einzelnen Nachweisfeldern hängengebliebenen Analyten getroffen werden.

5

Wenn der Assay mit einem ggf. geeignet angepaßten CD-ROM-Laufwerk ausgelesen wird, ermöglicht ein angeschlossener Computer dem Anwender die Weiterverarbeitung der von dem Laufwerk gelieferten Datenmenge, wobei er das Ergebnis dieser Weiterverarbeitung auf externen Datenspeichern abspeichern kann, beispielsweise um Datenbanken über Patienten zu erstellen. Zur Datenspeicherung können herkömmliche Standardspeicher, etwa Festplatten oder Floppy-Discs, verwendet werden. Mit Computerhilfe ist eine schnelle Auswertung der Datenflut des Laufwerks möglich. Die Kapazität herkömmlicher Computer und Speichersysteme ist in der Regel so
10 ausreichend, daß auch komplexe Genanalysen darauf durchgeführt werden können.
15

In der Regel wird es erwünscht sein, scharf definierte Nachweisfelder zu erhalten, die zusätzlich sehr klein sein sollen, um eine hinreichende Zahl von
20 Nachweisfeldern auf der Substratscheibe unterzubringen, die zweckmäßigerweise die Größe einer herkömmlichen CD (Compact Disc) besitzt. Wenn man davon ausgeht, daß der radiale Abstand zweier aufeinanderfolgender Spiralwindungen zweckmäßigerweise etwa $1,6 \mu\text{m}$ beträgt, so empfiehlt es sich, die Binder in Feldern aufzubringen, die radial nicht breiter als $1 \mu\text{m}$
25 sind, damit zwischen bezogen auf die Scheibenachse radial benachbarten Nachweisfeldern ein hinreichender Abstand besteht und jedes einzelne Nachweisfeld als solches orts aufgelöst werden kann. Bevorzugt sind die Nachweisfelder radial sogar schmaler als $1 \mu\text{m}$, wobei es zweckmäßig sein kann, sie mit einer radialen Breite auszubilden, die im wesentlichen der
30 Breite der bei herkömmlichen CDs eingepprägten Datenvertiefungen (sogenannte Pits) entspricht, nämlich etwa $0,5 \mu\text{m}$. Gleichfalls empfiehlt es sich, entlang der Spirallinie bzw. einer Kreislinie einander benachbarte

GEAENDERTES BLATT

- 7 -

Nachweisfelder mit Abstand voneinander anzuordnen, um deren individuelle Auflösung durch das Auswertesystem zu ermöglichen. Die Nachweisfelder können als im wesentlichen quadratische oder kreisförmige Flächen ausgebildet werden. Denkbar ist auch, sie entsprechend der Gestalt der Datenpits herkömmlicher CDs in Umfangsrichtung, also in Spiral- bzw. Kreislinienrichtung, länglich auszubilden, etwa oval oder rechteckig.

Um die Binder unter den vorstehend skizzierten dimensionellen Randbedingungen für die Nachweisfelder auf das Substrat aufzubringen, eignen sich insbesondere Mikroprinttechniken, Tintenstrahltechniken oder Elektrospraytechniken. Zum Nachlesen, was Mikroprinttechniken anbelangt, wird beispielhaft verwiesen auf: "Microfabrication, Microstructures and Microsystems" von Dong Qin et al., "Topics In Current Chemistry", Band 194, 1998, Seite 6ff., Springer-Verlag. Bezüglich Tintenstrahltechniken wird beispielhaft verwiesen auf: "A new device for multifunctional dosage of liquids by a free jet" von N. Hey et al., Proceedings IEEE-Mems 1998, CH 36176. Elektrospraytechniken, insbesondere Nanoelektrospraytechniken, können beispielsweise in "Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source" von M. Wilm und M. Mann in Analytical Chemistry, Band 68, Nr. 1, 1. Januar 1996, Seiten 1-8, sowie in "Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?" von M. Wilm, M. Mann in International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 136 (1994), Seiten 167-180, nachgelesen werden. Diese Techniken ermöglichen es, die Nachweisfelder mit hoher Ortsauflösung gezielt mit vorbestimmten Bindern zu versehen. Die Binder können auf die Außenoberfläche der Substratscheibe aufgebracht werden. Denkbar ist es auch, in Analogie zu den Datenpits herkömmlicher CDs kleine Vertiefungen in die Außenoberfläche des Substrats einzubringen und darin die analytspezifischen Binder zu immobilisieren. Falls solche Vertiefungen für die Binder vorgesehen werden, wird es zweckmäßig sein, diese mit einer radialen Breite von etwa $0,5 \mu\text{m}$ auszubilden, entsprechend der Breite der Datenpits herkömmlicher CDs.

- 8 -

Um biologische Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu untersuchen, kommen als Analyten insbesondere Nukleinsäuren oder/und Proteine in Betracht. So kann das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, um Protein/Protein-Wechselwirkungen, wie sie beispielsweise während der Genexpression oder als Zellsignale auftreten, Enzym/Substrat- oder Enzym/Effekt-Wechselwirkungen während des Stoffwechsels oder Protein/DNA- oder Protein/RNA-Wechselwirkungen während der Genexpression nachzuweisen.

Durch geeignete Wahl der Binder in den Nachweisfeldern können auch DNA/DNA-Wechselwirkungen nachgewiesen werden, wie es insbesondere zur Genidentifizierung und zur Kartierung von Genen, beim Untersuchen und Quantifizieren der Genexpression sowie bei der molekularen Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen von Bedeutung ist.

Molekulare Wechselwirkungen und Enzymaktivitäten können durch die Bindung von RNA-Aptameren oder kleinen chemischen Verbindungen an Makromoleküle beeinflußt werden. Natürliche und synthetische Effek-
tormoleküle erlauben es deshalb häufig, biochemische Verfahren durch Modulation von oder Eingreifen in makromolekulare Wechselwirkungen zu manipulieren.

Bevorzugt handelt es sich bei dem Substratmaterial um ein nicht poröses Material. Die Verwendung eines nicht porösen Trägers ermöglicht das definierte Aufbringen auch kleiner Nachweisfelder, so daß eine Miniaturisierung des Testformats bzw. das Aufbringen einer Vielzahl von Nachweisfeldern möglich ist. Geeignete Materialien für das scheibenförmige Substrat sind z. B. Kunststoffe und Glas. Für CD-ROM-Laufwerksapplikationen handelt es sich bevorzugt um ein fokussierendes Material, insbesondere um Polycarbonat.

- 9 -

Die Immobilisierung der Binder an den Nachweisfeldern kann nach an sich bekannten Verfahren durchgeführt werden. Die Immobilisierungsstrategie hängt von der Art des zu immobilisierenden Moleküls und des jeweiligen Substrats ab. Im allgemeinen können Binder direkt an eine Matrix über eine chemische Reaktion gebunden werden, beispielsweise über eine spezielle Aminosäure in einem Protein (insbesondere Cystein oder Lysin) oder über das Phosphatgrundgerüst einer DNA. Die Immobilisierung kann auch mit bifunktionellen chemischen Quervernetzern oder über eine spezifische hochaffine Wechselwirkung, wie etwa die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung durchgeführt werden. Die analytspezifischen Binder können auf der Oberfläche auch adsorbiert werden, wobei eine kovalente Bindung jedoch bevorzugt ist. Als Binder werden auf die Oberfläche des Substrats Substanzen oder/und Moleküle aufgebracht, die in der Lage sind, den gewünschten Analyten spezifisch, insbesondere mit hoher Affinität, zu binden.

Nach Inkontaktbringen der Meßprobe mit den Nachweisfeldern wird das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch optische Auswertung der Nachweisfelder ermittelt. Hier können alle dem Fachmann bekannten Methoden herangezogen werden. Ein übliches Verfahren, um molekulare Wechselwirkungen zu analysieren, besteht aus mehreren Schritten: Ein erster Wechselwirkungspartner, z. B. ein analytspezifischer Binder oder Rezeptor, wird mit einem festen Träger kovalent oder adsorptiv verknüpft. Beim Inkontaktbringen der Meßprobe mit den Nachweisfeldern kann ein zweiter Wechselwirkungspartner, z. B. der Analyt, mit dem Rezeptor wechselwirken. Anschließend wird das Vorhandensein des Analyten (oder das Nichtvorhandensein in kompetitiven Testformaten) an der Stelle, an der der Rezeptor immobilisiert ist, nachgewiesen. Die Wechselwirkung zwischen den zwei Bindepartnern wird bevorzugt unter Bedingungen durchgeführt, bei denen beide Reaktanten in einer nativen, aktiven Konfiguration vorliegen, bevorzugt in einer flüssigen Reaktion. Besonders bevorzugt wird das Inkontaktbringen unter einem

- 10 -

annähernd physiologischen pH-Wert und bei ionischen Bedingungen durchgeführt.

Der Nachweis erfolgt beim erfindungsgemäßen Verfahren durch Detektion
5 einer Änderung der optischen Eigenschaften der Nachweisfelder. Die
optische Änderung der Nachweisfelder kann z. B. durch Isotope, Enzyme,
Fluorochrome, Farbstoffe, Metallkolloide, Beads oder ähnliches herbei-
geführt werden, die als Markersystem dienen. Zum Nachweis wird einer der
Wechselwirkungspartner, d. h. der Rezeptor oder der Analyt, direkt oder
10 indirekt markiert. Bevorzugt werden zur Detektion Proteine oder Nu-
kleinsäuren mit einer Biotineinheit derivatisiert, wonach eine Erkennung
durch Streptavidinkonjugate möglich ist.

Bevorzugt resultiert das Nachweisverfahren in der Präzipitation eines
15 Farbstoffs oder der Lokalisierung eines Fluorochroms an der Stelle der
molekularen Wechselwirkung oder in der Anlagerung von Metall-Clustern
mit starker elektromagnetischer Wechselwirkung. Latex-Beads oder
Kunststoff-Beads können ebenfalls angebunden werden. Sie bewirken
aufgrund ihres Brechungsverhaltens und ihrer gekrümmten (sphärischen)
20 Oberfläche eine Streuung des einfallenden Ausleselichts, die als Intensitäts-
minderung detektierbar ist. Bei geeigneter Dimensionierung der Beads
können Effekte der destruktiven Interferenz erzielt werden.

Die wechselwirkenden Moleküle, also der Rezeptor und der Analyt, können
25 entweder direkt über ihre spezifischen Bindestellen nachgewiesen werden
oder indirekt, indem sie mit einem Marker versehen werden, der eine
bekannte spezifische Bindestelle enthält. Beispiele für solche Marker sind
Epitope, für die monoklonale Antikörper bekannt sind, oder eine Biotingrup-
pe, die mit Streptavidin bindefähig ist. Daneben ist auch das direkte
30 spezifische Binden eines Antikörpers an den Analyten möglich. Antikörper
und Streptavidin werden bevorzugt mit einem Enzym konjugiert, um eine
Auswertung der Nachweisfelder zu ermöglichen. Beispiele für bevorzugte

- 11 -

Enzyme sind Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase und β -Galaktosidase. Bei Zugabe geeigneter Substrate läuft eine enzymatische chromogene Reaktion ab, wobei gefärbte Produkte entstehen, die an den Orten präzipitieren, an denen die Enzyme gebunden sind und somit das Vorhandensein des Analyten anzeigen. Geeignete Substrate der obigen Enzyme, die eine optische Auswertung ermöglichen, sind für Meerrettichperoxidase beispielsweise Diaminobenzidin (DAB), welches ein in Wasser und Ethanol unlösliches braunes Produkt ergibt, DAB + Metall, welches in Gegenwart von Kobalt oder Nickel ein graues bis schwarzes unlösliches Produkt ergibt, Chlornaphtol, das eine blau-schwarze, wasserlösliche Färbung ergibt, Aminoethylcarbazol, das ein rotes, wasserunlösliches Produkt ergibt. Bevorzugte Substrate für alkalische Phosphatase sind Naphthol-AS-BI-Phosphat/New-Fuchsin, was ein rotes, unlösliches Produkt ergibt, Bromchlorindolylphosphat/Nitrotetrazolium, was ein schwarz-violettes Präzipitat ergibt, und für β -Galaktosidase Bromchlorindolyl-b-D-Galaktopyranosid (BCIG), was ein unlösliches blaues Produkt ergibt. Der Nachweis der Analyten kann hier leicht durch optische Detektion des gefärbten Bereichs erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Wechselwirkungsstellen ist die Anfärbetechnik mit Goldkolloiden, wobei auch andere Typen von Metallclustern bzw. -Beads verwendet werden können. Hier sind insbesondere Silberpartikelchen vorteilhaft, die die Sensitivität eines optischen Nachweissystems aufgrund nichtlinearer optischer Effekte nahe einer Metalloberfläche der Reflexionsschicht erhöhen können. Weiterhin bevorzugt ist die Verwendung von Farbstoffen als Marker, insbesondere von gefärbten Latexpartikeln. Es können auch Glas-Beads aus Siliziumdioxid verwendet werden, die mit einem Farbstoff in hoher Konzentration gefüllt sind.

Neben der Messung der Absorption ist bei Wahl geeigneter Marker, beispielsweise fluoreszierender Stoffe, auch eine Messung der Fluoreszenz möglich, wobei hier die Detektionswellenlänge eine andere als die einge-

- 12 -

strahlte Wellenlänge ist. Sofern marktgängige CD-Laufwerke, insbesondere CD-ROM-Laufwerke, bei der Auswertung herangezogen werden sollen, können im Fall von Fluoreszenzmessungen konstruktive Laufwerksmodifikationen neben einer entsprechenden Anpassung der Software erforderlich
5 sein. Insbesondere kann es notwendig sein, einen speziell auf die Fluoreszenzwellenlänge abgestimmten Detektor einzubauen.

Die Erfindung ermöglicht es, auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats zusätzliche Informationen einzuschreiben, die
10 zeitgleich mit den Nachweisfeldern ausgelesen und ausgewertet werden können. Demgemäß wird vorgeschlagen, daß auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats entlang der Spirallinie bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich Datenfelder ausgebildet werden, welche meßprobenbezogene oder/und nachweisfeldbezogene oder/und auswertungs-
15 bezogene Informationen enthalten. Bei den meßprobenbezogenen Informationen kann es sich beispielsweise um Informationen über Ort und Zeit der Gewinnung der Meßprobe, über die Art der Meßprobe oder über die Person handeln, der die Meßprobe entnommen wurde. Die nachweisfeldbezogenen Informationen können molekularbiologische oder biochemische Angaben
20 über die Nachweisfelder enthalten, insbesondere über den Bindertyp der einzelnen Nachweisfelder. Die auswertungsbezogenen Informationen können Angaben über das zum Nachweis der Analyten angewendete Detektionsprinzip, etwa enzymatische Detektion, Detektion über Farbstoffe, Detektion über Metall-Cluster oder dergleichen, enthalten. Ferner können sie Angaben
25 darüber enthalten, welches physikalische Abtastprinzip ein Lesegerät anwenden soll, etwa eine Absorptionsmessung oder eine Fluoreszenzmessung. Zudem können die auswertungsbezogenen Informationen dem Lesegerät Lage und Ort der Nachweisfelder auf dem Substrat angeben und ihm damit signalisieren, wann das Lesegerät von einer Software zum Lesen
30 der Datenfelder auf eine Software zum Lesen der Nachweisfelder umschalten soll. Insbesondere ist denkbar, daß die auswertungsbezogenen Informationen schon zumindest Teile einer Auswerte-Software enthalten, die

GEAENDERTES BLATT

- 13 -

vom Lesegerät bei der Auswertung der Nachweisfelder abgearbeitet wird. Auf diese Weise kann der Anwender von mühsamen Programmierungsaufgaben zur Softwareanpassung seines Computerarbeitsplatzes entlastet werden. Die vollständige Auswerte-Software kann bereits herstellerseitig,
5 soweit geeignete Software-Standards existieren, in den Sensor eingeschrieben werden.

Grundsätzlich ist es denkbar, die Nachweisfelder und die Datenfelder längs der Spirallinie getrennt anzuordnen. Es kann aber zweckmäßig sein,
10 Nachweisfelder und Datenfelder abwechselnd entlang der Spirallinie anzuordnen, beispielsweise in der Weise, daß einem einzelnen Nachweisfeld oder einer Gruppe von Nachweisfeldern ein Datenfeld zugeordnet wird, das dem Nachweisfeld bzw. der Gruppe von Nachweisfeldern längs der Spirallinie vorhergeht und dem Auswertesystem Informationen über dieses
15 Nachweisfeld bzw. diese Gruppe von Nachweisfeldern liefert.

Sofern die Nachweisfelder längs konzentrischer Kreislinien angeordnet werden, können Nachweisfelder und Datenfelder ebenfalls abwechselnd entlang mindestens einer Kreislinie angeordnet werden. Denkbar ist aber
20 auch, daß Nachweisfelder und Datenfelder jeweils auf gesonderten Kreislinien ausgebildet werden.

Die Datenfelder sollen zweckmäßigerweise von der gleichen Seite der Substratscheibe her ausgelesen werden können wie die Nachweisfelder.
25 Dabei besteht eine Möglichkeit darin, zur Bildung der Datenfelder Vertiefungen in die Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats einzubringen, wobei ^{die Reflexionsseite} ~~der Reflektor~~ so angebracht wird, daß ^{sie} ~~er~~ in die Vertiefung hineinreicht. Zweckmäßigerweise erfolgen die Codierung der Daten und die Anordnung der Vertiefungen nach Maßgabe eines gängigen
30 CD-Formats, insbesondere des CD-ROM-Formats, so daß die Datenfelder mittels herkömmlicher CD-Laufwerke ohne Softwaremodifikationen gelesen werden können.

GEAENDERTES BLATT

- 14 -

Es ist sogar denkbar, zur Bildung der Datenfelder auf Vertiefungen zu verzichten. Durch Anbindung von optisch absorbierenden oder streuenden Substanzen an das Substrat kann ebenfalls Einfluß auf die Reflexion des zur Auslesung auf die Nachweis- und Datenfelder gerichteten Lichtstrahls
5 genommen werden. So ist es denkbar, bei geeigneter Wahl von Metall- oder Kunststoff-Beads ähnliche Effekte destruktiver Interferenz zu erzielen, wie sie auch durch Vertiefungen in der Substratoberfläche erreicht werden. Es kann daher vorgesehen sein, daß zur Bildung der Datenfelder eine einfallendes Leselicht beeinflussende Substanz auf die die Nachweisfelder
10 tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird.

^{die}
Weil ~~bei Ausbildung des Reflektors als auf das Substrat aufgetragene~~
Reflexionsschicht ~~die letztere~~ erst nach Abschluß sämtlicher molekularbiolo-
gischer oder biochemischer Analyseschritte aufgebracht wird, sind Vorher-
15 Nachher-Messungen der Nachweisfelder nicht möglich, also Messungen vor und nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern. Um dennoch aus den Meßsignalen verlässliche Aussagen darüber zu gewinnen, ob und welche Nachweisfelder mit Analyten besetzt sind, kann es vorteilhaft sein, auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des
20 Substrats entlang der Spirallinie bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich mindestens ein Referenzfeld auszubilden, dessen optische Eigenschaften als Referenz bei der Auswertung der Nachweisfelder verwendet werden. Beispielsweise können diese Referenzfelder einen bekannten, für analytfreie Nachweisfelder typischen Referenzabsorptionsgrad für das Licht des
25 abtastenden Lichtstrahls besitzen, der von einem Absorptionsgrad unterscheidbar ist, den analytbehaftete Nachweisfelder typischerweise besitzen. Daneben können auch Referenzfelder ausgebildet sein, die den Analyten oder/und Marker enthalten und die bei korrekter Durchführung des Verfahrens als positive Kontrolle dienen. Die Referenzfelder können zudem
30 zur Kalibrierung und zur Quantifizierung der Messungen herangezogen werden.

- 15 -

Im Bereich der Nachweisfelder kann sich eine verminderte Haftung der Reflexionsschicht einstellen, wenn diese unmittelbar auf die darunterliegende molekularbiologische oder biochemische Ebene aufgebracht wird. In diesem Fall kann es günstig sein, nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern zunächst eine Deckschicht aus einem optisch transparenten Material auf die Nachweisfelder aufzubringen, bevor die Reflexionsschicht aufgebracht wird. Die Deckschicht kann auch zur Fixierung der Reagenzien in den Nachweisfeldern dienen. Das Material und die Dicke der Deckschicht wird man so aufeinander abstimmen, daß eine Beeinflussung der optischen Eigenschaften des Sensors durch die Deckschicht, etwa durch Fokussierungs- oder Absorptionseffekte, nicht oder zumindest in beherrschbarer Weise erfolgt. Ein Material auf Polymerbasis hat sich für die Deckschicht als geeignet gezeigt. Sie kann z. B. als Folie oder mittels eines Sprühverfahrens aufgebracht werden. Sofern der Sensor auch Vertiefungen in Datenfeldern aufweist, wird man sicherstellen müssen, daß die Vertiefungen nicht durch das Material der Deckschicht wieder aufgefüllt werden, um einen Verlust der durch die Vertiefungen repräsentierten Dateninformationen zu vermeiden. Sprühverfahren sind zur lokalen Aufbringung der Deckschicht denkbar. Vorstellbar ist es auch, die Oberfläche der Substratscheibe gedanklich in Segmente, etwa Kreissektoren, aufzuteilen, von denen ein Teil ausschließlich für Nachweisfelder und ein anderer Teil ausschließlich für Datenfelder reserviert wird. Die Segmente mit Datenfeldern können dann sehr leicht von der Deckschicht freigehalten werden.

Das Substrat mit den darauf immobilisierten Bindern kann als handelbare Einheit verpackt und an Anwender verschickt werden. Denkbar ist es, daß der Hersteller einen kundenspezifischen Satz von Bindern zusammenstellt und auf das Substrat aufbringt. Vorstellbar ist auch, kundenunspezifisch, aber applikationsspezifisch, beispielsweise für bestimmte Genanalysen, einen Satz von Bindern auf ein Substrat aufzubringen und dieses als vorbereiteten Meßträger anzubieten. Es empfiehlt sich, diesen Meßträger zu

- 16 -

trocknen, bevor er verpackt und verschickt wird. Die zu untersuchende Meßprobe wird dann vom Anwender, also vom Käufer des Meßträgers, aufgebracht. Gleiches kann auch für markerenthaltende Reagenzien gelten. Die Aufbringung der Reflexionsschicht und ggf. der Deckschicht nach
5 Abschluß des molekulargenbiologischen bzw. biochemischen Nachweisverfahrens, das auch Waschschrirte umfassen kann, kann beim Anwender erfolgen, sofern diesem hierfür geeignete Geräte zur Verfügung stehen. Denkbar ist auch, daß der Anwender den analytbehafteten Meßträger zum Hersteller oder zu einem anderen Labor zurücksendet, wo diese Schichten
10 aufgebracht werden.

Auf der Reflexionsschicht kann noch eine Schutzschicht flächig aufgebracht werden, wobei sich wegen seiner Schlag- und Kratzfestigkeit ein Material auf Acrylbasis eignet. Der so geschützte Meßträger kann über lange
15 Zeiträume hinweg aufbewahrt werden und jederzeit wieder ausgelesen werden.

Die Erfindung betrifft ferner einen Meßträger zum Nachweis von Analyten *gemäß Anspruch 18, der zur Verwendung bei dem*
in einer Meßprobe, der sich insbesondere zur Durchführung des vorstehend
20 erläuterten Verfahrens ~~eignet.~~ *bestimmt ist.*

weiteren *ist erfindungsgemäß ein Verfahren gemäß*
Nach einem ~~anderen~~ Aspekt ~~geht die Erfindung zur Lösung der eingangs~~
Anspruch 23 vorgesehen.
~~gestellten Aufgabe von einem Verfahren zum Nachweis von Analyten in~~
einer Meßprobe aus, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf
25 mindestens einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird. Erfindungsgemäß ist hierbei vorgesehen,
30 daß die Nachweisfelder magnetisch ausgewertet werden und hierzu Binder oder die nachzuweisenden Analyten mit magnetischen oder/und magnetisierbaren Markern markiert werden und daß die Nachweisfelder längs einer

- 17 -

~~Vielzahl konzentrischer Kreislinien oder/und längs mindestens einer Spirallinie verteilt auf dem Substrat angeordnet werden.~~

Die kreis- oder spiralförmige Verteilung der Nachweisfelder auf dem Substrat ermöglicht die Verwendung marktgängiger Magnetplatten-Lesegeräte, sogenannter Hard-Disc-Laufwerke. Gegebenenfalls wird eine softwaremäßige Adaption der Laufwerkssteuerung notwendig sein. Die magnetische Auslesung der Nachweisfelder ermöglicht es sogar, auf beiden Flachseiten des Substrats Nachweisfelder auszubilden, so daß sich die Packungsdichte der Sensoren mit Nachweisfeldern weiter erhöhen läßt. Hinsichtlich der gegenseitigen Abstände, der Größe und der Anordnung der Nachweisfelder sowie etwaiger Daten- und Referenzfelder auf dem Substrat treffen im wesentlichen die Angaben zu, die zuvor für den optisch auslesbaren Sensor gemacht wurden.

15

Um zu verhindern, daß die Marker durch Kontakt mit einem Lesekopf des Auswertegeräts vom Substrat weggerissen werden, kann nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern eine Fixierschicht auf die Nachweisfelder aufgebracht werden. Diese wird man zweckmäßigerweise flächig auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufbringen. Für die Fixierschicht hat sich ein Material auf Polymerbasis als geeignet erwiesen.

20

~~Darüber hinaus kann~~ Vor der Ausbildung der Nachweisfelder oder nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern ^{wird} eine magnetische oder/und magnetisierbare Partikel enthaltende Magnetschicht flächig ^{über} auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht werden. Die Magnetschicht ermöglicht es, zusätzlich Daten in den Sensor einzuschreiben, die zusammen mit den Nachweisfeldern ausgelesen werden können. Die magnetischen Eigenschaften der Magnetschicht wird man so wählen, daß die durch die Marker hervorgerufenen lokalen Schwankungen der magnetischen Feldstärke oder der magnetischen Flußdichte nicht in folge

25

30

- 18 -

der Magnetschicht "verschwimmen" und undetektierbar werden. Zwar ist es grundsätzlich denkbar, daß die Magnetschicht unterhalb der molekularbiologischen oder biochemischen Schicht des Sensors unmittelbar auf das Substrat aufgebracht wird. Zweckmäßig ist es jedoch, sie erst nach
5 Abschluß der molekularbiologischen oder biochemischen Verfahrensschritte aufzubringen, da sie so zugleich als Fixierschicht dienen kann.

~~Die Erfindung betrifft ferner~~ ^F ein Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach dem vorstehend beschriebenen ersten oder zweiten Aspekt. ~~Das~~
10 ~~Testkit~~ umfaßt ~~dabei~~ einen mit immobilisierten Bindern vorbereiteten Meßträger, Reagenzien zur Durchführung des Nachweisverfahrens, insbesondere optisch oder/und magnetisch detektierbare Nachweisreagenzien, sowie ggf. Wasch- oder/und Pufferlösungen. Der Meßträger liegt bevorzugt in getrockneter Form vor.

15 Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung eines Meßträgers der vorstehend beschriebenen Art in einem Immunoassay oder/und Nukleinsäurehybridisierungsassay oder/und Lektin-Zucker-Assay oder/und Protein-Nukleinsäure-Assay.

20 Die Erfindung wird im folgenden anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Es stellen dar:

Fig. 1 eine schematische Schnittdarstellung eines erfindungsgemäßen
25 molekularbiologischen oder biochemischen Sensors ("Biosensor") mit Nachweis- und Datenfeldern und

Fig. 2 schematisch die Verteilung der Nachweis- und Datenfelder auf dem Biosensor.

30 In Fig. 1, die die realen Größenverhältnisse nicht getreu wiedergibt, ist der Biosensor allgemein mit 1 bezeichnet. Er besitzt die Form einer Kreisscheibe. Seine Größe entspricht zweckmäßigerweise der einer herkömmlichen

- 19 -

Compact Disc, deren Durchmesser üblicherweise etwa 12 cm beträgt. Der Biosensor 1 umfaßt ein Trägersubstrat 3, das aus einem optisch transparenten Material, vorzugsweise Polycarbonat, gefertigt ist. Auf der in Fig. 1 oberen Flachseite des Substrats 3 sind Nachweisfelder 5, 7 sowie Datenfelder 9 ausgebildet. In den Datenfeldern 9 sind Informationen über die Meßprobe oder/und über die Nachweisfelder oder/und über die Auswertung niedergelegt. Wie bei herkömmlichen CDs sind die Informationen in den Datenfeldern 9 durch abwechselnde vertiefte Bereiche 11 und nicht vertiefte Bereiche 13 des Substrats 3 repräsentiert.

In den Nachweisfeldern 5, 7 sind analytspezifische Binder bzw. Rezeptoren immobilisiert. Diese Binder sind in Fig. 1 schematisch durch kurze Striche 15 symbolisiert. Jedes Nachweisfeld 5, 7 trägt eine Vielzahl von Bindern 15 gleichen oder unterschiedlichen Typs. Das Nachweisfeld 7 repräsentiert in Fig. 1 ein Nachweisfeld, an dem nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern 5, 7 keine Analyten haftengeblieben sind. Dagegen repräsentiert das Nachweisfeld 5 ein Nachweisfeld, an dem Analyten haftengeblieben sind. Diese Analyten sind in Fig. 1 schematisch durch kleine Kreise 17 dargestellt, die zugleich die Marker symbolisieren, anhand deren die optische Detektion des Vorhandenseins der Analyten möglich ist.

Die Nachweisfelder 5, 7 sind in eine Deckschicht 19 eingebettet, die nur in den die Nachweisfelder 5, 7 tragenden Bereichen des Substrats 3 aufgebracht ist, nicht jedoch in den die Datenfelder 9 tragenden Bereichen des Substrats 3. Die Deckschicht 19 besteht ebenfalls aus einem optisch transparenten Material, vorzugsweise einem Polymermaterial. Sie fixiert die Marker auf dem Substrat 3 und dient zugleich als Haftvermittler zwischen dem Substrat 3 und einer Reflexionsschicht 21, die flächig auf das Substrat 3 aufgebracht ist, über sämtliche Nachweisfelder 5, 7 und sämtliche Datenfelder 9 hinwegreicht und in die Vertiefungen 11 der Datenfelder 9 hineinreicht. Die Reflexionsschicht 21 besteht vorzugsweise aus Aluminium, kann aber beispielsweise auch aus Silber bestehen und wird zweckmäßiger-

- 20 -

weise durch chemisches Aufdampfen erzeugt. Die Reflexionsschicht 21 dient als Reflektor für das Licht eines Laserstrahls 23, der von der Unterseite des Substrats 3 her zur Auslesung der Nachweisfelder 5, 7 und der Datenfelder 9 auf den Biosensor 1 gerichtet wird. Das reflektierte Licht
5 wird mittels gängiger Methoden ausgewertet. Beispielsweise wird es mittels eines Polarisationsfilters von dem eingestrahlteten Licht getrennt und sodann auf seine Intensität hin ausgewertet. Das Material des Substrats 3 hat vorteilhafterweise einen solchen Brechungsindex, daß der Laserstrahl 23 auf seinem Hinweg im Substrat 3 fokussiert wird, so daß der letztlich auf die
10 Nachweisfelder 5, 7 und die Datenfelder 9 einfallende Lichtfleck sehr klein gehalten werden kann.

Zur Oberseite hin ist der Biosensor 1 durch eine flächig aufgebrachte Deckschicht 25 abgeschlossen, die den Biosensor 1 vor schädlichen
15 chemischen oder mechanischen Einflüssen schützt. Vorzugsweise besteht sie aus einem Acrylmaterial.

Die Nachweisfelder 5, 7 und die Datenfelder 9 sind in abwechselnder Reihenfolge längs einer Spirallinie auf dem Substrat 3 angeordnet. Fig. 2
20 zeigt einen Ausschnitt zweier aufeinanderfolgender Windungen der Spirallinie. Letztere ist in Fig. 2 als gestrichelte Linie dargestellt und mit 27 bezeichnet. Mit d ist ferner der radiale Abstand zwischen den beiden Windungen, also die Spiralsteigung, bezeichnet. Er beträgt beispielsweise etwa $1,6 \mu\text{m}$. Die Vertiefungen 11, die bei Anwendung der für CDs,
25 insbesondere CD-ROMs, gängigen Codierung abgestuft variable Umfangslänge besitzen können, sind beispielsweise etwa $0,5 \mu\text{m}$ in radialer Richtung breit. Um radiale Überlappungen mit den Nachweis- oder Datenfeldern benachbarter Spiralwindungen zu vermeiden, sind die Nachweisfelder 5, 7 ebenfalls radial so schmal ausgebildet, daß ein hinreichender Abstand zu
30 den Feldern der benachbarten Spiralwindungen besteht. Insbesondere können die Nachweisfelder 5, 7 gleichfalls etwa $0,5 \mu\text{m}$ breit sein. Bei derartiger Bemessung kann ohne weiteres auch das "Ausfransen" in Kauf

- 21 -

genommen werden, das bei enzymatischem Nachweis der in den Nachweisfeldern 5 anhaftenden Analyten häufig zu beobachten ist. In Umfangsrichtung können die Nachweisfelder 5, 7 länglich sein, so daß sie mit einer hinreichend großen Gesamtfläche ausgebildet werden können. Auch in
5 Umfangrichtung werden die Nachweisfelder 5, 7 hinreichenden Abstand voneinander und von den Datenfeldern 9 aufweisen.

Die vorstehenden Maßangaben empfehlen sich insbesondere, wenn zur Auslesung der Daten- und Nachweisfelder CD-Laufwerke mit einem
10 Fleckdurchmesser des Laserstrahls 23 von etwa $2\text{ }\mu\text{m}$ verwendet werden.

Nachfolgend werden noch einige molekularbiologische oder biochemische Anwendungsbeispiele der Erfindung erläutert.

15 Beispiel 1

Anwendungen

Die Anwendungen können gemäß der Natur des immobilisierten Bindepartners (A), des analytspezifischen Binders, und der Natur seines "Liganden", d. h. des Analyten (B), klassifiziert werden. Als Wechselwirkungspartner
20 werden bevorzugt Nukleinsäuren und/oder Proteine verwendet, es können jedoch auch andere Partner von spezifischen Bindepartnern, wie etwa Lektine oder Zucker eingesetzt werden.

Bevorzugt werden die Rezeptoren bzw. Analyte, insbesondere Proteine und
25 Nukleinsäuren, mit einer Biotingruppe derivatisiert, wobei die Biotingruppe dann vorteilhaft mit einem Streptavidin-Enzymconjugat, wie etwa Meerrettichperoxidase, nachgewiesen wird. Das Substrat der Enzymreaktion wird derart ausgewählt, daß sich an der Stelle der molekularen Wechselwirkung ein intensives, dunkles Präzipitat bildet, das den Detektionslaser quentscht.
30 Daneben kann der Nachweis auch durch direkte Derivatisierung eines Wechselwirkungspartners mit einem Fluorochrom in Kombination mit einem geeigneten Laser erfolgen.

GEAENDERTES BLATT

- 22 -

Beispiel 1.1

Der Rezeptor (A) ist ein RNA-Aptamer, ein Peptid oder ein natürliches oder synthetisches Effektormolekül und der Analyt (B) ist ein Protein.

- 5 Die Eigenschaften eines Enzyms oder Regulationsfaktors bei der Genexpression werden häufig durch die Assoziation kleiner Effektor- oder Ligandmoleküle moduliert. Ein Beispiel sind Hormonrezeptoren, die nach Bindung an das Hormon in eine aktive Konformation überführt werden. Die Proteinfunktion kann durch Wechselwirkung eines Substratanalogons oder
- 10 durch allosterische Effektoren moduliert werden. Um geeignete kleine Chemikalien zu identifizieren, werden Screening-Verfahren für Liganden durchgeführt, wobei eine große Anzahl an verschiedenen Chemikalien untersucht wird.
- 15 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, chemische Bibliotheken durchzutesten. Dabei wird eine Vielzahl von verschiedenen kleinen Chemikalien in einer definierten Ordnung auf dem Meßträger immobilisiert, wobei das fragliche Protein unter verschiedenen Stringentbedingungen damit in Kontakt gebracht wird. Gebundenes Protein wird, wenn es mit
- 20 einem geeigneten Fluorochrom, beispielsweise einem Latexpartikel, markiert ist, direkt nachgewiesen oder indirekt unter Verwendung einer Enzymamplifikationskaskade. In entsprechender Weise können große Bibliotheken von RNA-Aptameren oder Peptiden gescreent werden, entweder isoliert oder in ein Fusionsprotein eingebunden, hinsichtlich Wechselwirkungen mit einem
- 25 in Frage stehenden Protein.

Beispiel 1.2

Der Rezeptor (A) ist ein Protein und der Analyt (B) ist eine Nukleinsäure oder ein Ligant.

30

Proteinbibliotheken können hinsichtlich bestimmter Bindeeigenschaften, z. B. der Wechselwirkung mit einer definierten DNA-Sequenz gescreent

- 23 -

werden. Vervielfältigte Meßträger, die definierte Bereiche von Proteinen enthalten, die zusammen die Produkte einer cDNA-Expressionsbibliothek darstellen, können mit spezifischen Liganten oder DNA-Bindestellen charakterisiert werden. Die angeordneten Proteine können so, wie sie in der
5 Bibliothek sind, unbekannt sein und erst durch das erfindungsgemäße Verfahren zugeordnet werden. Alternativ können Bereiche von bekannten Proteinen oder Derivate eines definierten Proteins, wie etwa das Produkt einer zufälligen Mutagenese, untersucht werden.

10 Beispiel 1.3

Der Rezeptor (A) ist eine DNA oder RNA und der Analyt (B) ist ein Protein.

Eine große Anzahl von verschiedenen doppelsträngigen DNA-Fragmenten kann auf den Nachweisfeldern aufgebracht werden. Dabei kann es sich
15 entweder um kleine Fragmente, beispielsweise um Oligonukleotide oder um größere DNA-Fragmente bis zu sehr großen DNA-Abschnitten handeln, die eine geordnete Bibliothek von genomischen DNA-Fragmenten darstellen. Die Anwendungen umfassen die systematische Suche nach möglichen genomischen Bindestellen für DNA-Bindeproteine, aber auch andere DNA-
20 Bindemoleküle können nachgewiesen werden, wie etwa Interkalatoren, kleine Moleküle mit Bevorzugung bestimmter Sequenzen, PNAs und Sequenzen, die eine Trippelhelix bilden. Ebenso können als Rezeptormoleküle in den Nachweisfeldern RNA-Moleküle aufgebracht werden, wie etwa die Transskripte einer cDNA-Bibliothek oder die Derivate einer definierten
25 RNA, wie etwa das Produkt einer zufälligen Mutagenese.

Beispiel 2

Nukleinsäureuntersuchungen

30 Der Rezeptor (A) ist eine einzelsträngige DNA und der Analyt (B) ist eine einzelsträngige DNA oder RNA.

Beispiel 2.1

DNA-Kartierung

Es ist inzwischen möglich, ganze Genome zu sequenzieren und die Genome von höheren Eukarionten, wie etwa Menschen, Mäusen und Fliegen, werden kartiert und durch geordnete Klone (wie etwa P1-Phagenklone) abgedeckt, wobei davon ausgegangen wird, daß die Sequenzen aller Genome in absehbarer Zeit erhältlich sind. Hier können erfindungsgemäße Meßträger hergestellt werden, die ganze Genome in geordneten Arrays oder Bereichen enthalten. Damit ist es möglich, ein kloniertes Stück DNA in einem einzigen Hybridisierungsschritt seiner genomischen Lokalisierung zuzuordnen und abhängig von der Auflösung des Arrays (welche eine Funktion der mittleren Sequenzlänge und der Zahl an einzelnen DNA-Molekülen ist) sogar das Gen selbst zu identifizieren. Ein Beispiel einer solchen Anwendung sind die P1-Arrays von Genome Systems, welche bisher schlecht zu screenen sind, da sie nur auf Membranen erhältlich sind. Ein Aufbringen dieser P1-Arrays auf den erfindungsgemäßen Meßträgern ermöglicht eine einfache und unkomplizierte Anwendung. Translokationen und andere genomische Umordnungen, die häufige Ursache genetischer Erkrankungen sind, können ebenfalls auf einfache Weise kartiert werden, einschließlich Deletionen des mitochondrialen Genoms. Darüber hinaus können Insertionen von Transgenen leicht kartiert werden, wenn die insertierte DNA zusammen mit einer kleinen Menge an flankierender genomischer DNA nachgewiesen wird.

Beispiel 2.2

Genidentifizierung und/oder Genklonen

Arrays oder Bereiche von diagnostischen Oligonukleotiden, die alle bekannten Gene einer gegebenen Spezies darstellen, ermöglichen die direkte Identifizierung eines in Frage stehenden Gens. Hierzu können z. B. cDNA-Arrays von Klontech oder die DNA-Chips von Affimetrix, auf denen alle Hefegene aufgetragen sind, durch Übertragung auf die erfindungsgemäßen Meßträger verbessert werden.

- 25 -

Beispiel 2.3

Expressions-Profiluntersuchungen

Durch Aufbringen von DNA auf erfindungsgemäße Meßträger, die alle Gene eines Organismus zeigen, kann das Expressionsprofil untersucht werden.

5 Auf den Meßträger wird ein komplexes Gemisch von RNA aufgebracht, die den Expressionszustand einer bestimmten Zelle darstellen oder eine davon abgeleitete cDNA-Population. Der auf dem Meßträger festgestellte Expressionszustand kann leicht mit dem Expressionszustand anderer Zellen verglichen werden, die von anderen Gewebe stammen, andere Entwicklungsstadien oder andere Stoffwechselstadien darstellen. Alternativ können

10 DNA-Proben untersucht werden, die bestimmte ausgewählte DNA-Zustände darstellen, wie etwa Zellzyklusgene, Signalübermittlerkomponenten usw. Da die erfindungsgemäßen Meßträger über lange Zeit gelagert werden können, können Expressionsprofile erstellt werden, die archiviert und zu Vergleichs-

15 zwecken herangezogen werden können.

Beispiel 2.4

Molekulare Diagnose von DNA-Polymorphismen

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Diagnose von üblichen und

20 seltenen DNA-Polymorphismen verwendet werden, einschließlich der Kartierung von Mutationen in Proto-Onkogenen, die übliche Tumore hervorrufen. Eingeeigneter Meßträger enthält überlagernde Oligonukleotide, die zusammen ein gesamtes Gen (z. B. die Wildtypsequenz) umfassen, zusammen mit Oligonukleotiden, die alle möglichen oder häufig auftretende

25 Mutationen dieser Sequenz enthalten. Das entsprechende DNA-Fragment wird von Patienten durch PCR isoliert und an den relevanten Gen-Meßträger unter Bedingungen hybridisiert, unter denen die Hybridisierung nur bei einer perfekten Sequenzübereinstimmung stattfindet. Ein Vergleich der Hybridisierung der experimentellen DNA an Wildtyp- bzw. Mutantoligonukleotide

30 ermöglicht es, exakt festzustellen, welche Art von Mutation in einer Sequenz auftritt.

- 26 -

Beispiel 3

Neben den oben beschriebenen Anwendungen, bei denen ein einfacher Bindevorgang nachgewiesen wird, der Signale ergibt, die ggf. durch eine Enzymkaskade verstärkt werden können, um die Sensitivität der Detektion zu erhöhen, kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Anwendungen verwendet werden, die umfangreichere Behandlungen des Meßträgers erfordern, wie etwa eine PCR-Amplifizierung, die analog zu in situ PCR-Amplifikationen durchgeführt wird. Auf diese Weise können auch infizierende Mittel nachgewiesen werden.

- 27 -

Neue Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, bei dem
5 auf einem scheibenförmigen Substrat (3) auf einer seiner Flachseiten
analytspezifische Binder (15) in einer Vielzahl von Nachweisfeldern
(5, 7) immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den
Nachweisfeldern (5, 7) gebracht wird und anschließend das Vorhan-
densein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten (17)
10 durch optische Auswertung der Nachweisfelder (5, 7) ermittelt wird,
~~dadurch gekennzeichnet, daß~~ ^{wobei} ein aus einem optisch transparenten
Material gefertigtes Substrat (3) verwendet wird, ^{und} ~~daß~~ die Nachweis-
felder (5, 7) längs mindestens einer Spirallinie (27) oder/und längs
einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien verteilt auf dem Substrat (3)
15 ^{dadurch gekennzeichnet,} angeordnet werden, ^{und} ~~daß~~ nach Inkontaktbringung der Meßprobe
mit den Nachweisfeldern (5, 7) ein optischer ^e ~~Reflektor (21) der die~~ ^{Reflexionsschicht (21) auf der}
~~die~~ Nachweisfelder (5, 7) tragenden Flachseite des Substrats (3) <->.
~~benachbart angeordnet wird.~~
2. ~~Verfahren nach Anspruch 1,~~
dadurch ~~gekennzeichnet, daß der Reflektor von einer~~
~~Reflexionsschicht (21) gebildet wird, welche auf das Substrat (3)~~
< über den Nachweisfeldern (5, 7) aufgebracht wird. >
- 25 ~~3.~~ ¹ Verfahren nach Anspruch ~~2~~,
dadurch gekennzeichnet, daß die Reflexionsschicht (21) aus
Aluminium gebildet wird.
4. ~~Verfahren nach Anspruch 1,~~
30 ~~dadurch gekennzeichnet, daß der Reflektor im Abstand von dem~~
~~Substrat angeordnet wird.~~

- 28 -

3) ~~8.~~

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 ^{und 2} ~~bis 4~~,
dadurch gekennzeichnet, daß bezogen auf die Scheibenachse radial
benachbarte Nachweisfelder (5, 7) mit radialem Abstand voneinander
angeordnet werden.

5

4) ~~8.~~

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis ~~8~~,³
dadurch gekennzeichnet, daß entlang der Spirallinie (27) bzw. einer
Kreislinie einander benachbarte Nachweisfelder (5, 7) mit Abstand
voneinander angeordnet werden.

10

5) ~~8.~~

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis ~~8~~,⁴
dadurch gekennzeichnet, daß auf der die Nachweisfelder (5, 7)
tragenden Flachseite des Substrats (3) entlang der Spirallinie (27)
bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich Datenfelder (9) ausgebil-
det werden, welche meßprobenbezogene oder/und nachweisfeldbezo-
gene oder/und auswertungsbezogene Informationen enthalten.

15

6) ~~8.~~

Verfahren nach Anspruch ~~7~~,⁵
dadurch gekennzeichnet, daß Nachweisfelder (5, 7) und Datenfelder
(9) abwechselnd entlang der Spirallinie (27) bzw. mindestens einer
Kreislinie angeordnet werden.

20

7) ~~8.~~

Verfahren nach Anspruch ~~7~~,⁵
dadurch gekennzeichnet, daß Nachweisfelder und Datenfelder jeweils
auf gesonderten Kreislinien ausgebildet werden.

25

8) ~~10.~~

Verfahren nach einem der Ansprüche ~~7~~ bis ~~8~~,^{5 7}
dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung der Datenfelder (9)
Vertiefungen (11) in die die Nachweisfelder (5, 7) tragende Flachseite
des Substrats (3) eingebracht werden und daß ^{die Reflexionsschicht} der Reflektor (21) so
^{auf} eingebracht wird, daß ^{sie} in die Vertiefungen (11) hineinreicht.

30

- 29 -

9, 11. Verfahren nach einem der Ansprüche ⁵7 bis ⁷8,
dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung der Datenfelder eine einfallendes Leselicht beeinflussende Substanz auf die die Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird.

5
10, 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis ⁹11,
dadurch gekennzeichnet, daß auf der die Nachweisfelder (5, 7) tragenden Flachseite des Substrats (3) entlang der Spirallinie (27) bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich mindestens ein Referenzfeld ausgebildet wird, dessen optische Eigenschaften als Referenz bei
10 der Auswertung der Nachweisfelder (5, 7) verwendet werden.

11, 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis ¹⁰12,
dadurch gekennzeichnet, daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern (5, 7) ^{vor Aufbringung der Reflexionsschicht (27)} ~~unterhalb des Reflektors~~ eine
15 Deckschicht (19) aus einem optisch transparenten Material auf die Nachweisfelder (5, 7) aufgebracht wird.

12, 14. Verfahren nach Anspruch ¹¹13,
20 dadurch gekennzeichnet, daß für die Deckschicht (19) ein Material auf Polymerbasis verwendet wird.

13, 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis ¹²14,
dadurch gekennzeichnet, daß ein Substrat (3) aus Polycarbonat
25 verwendet wird.

14, 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis ¹³15,
dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (3) an einem Herstellungsort mit den Bindern (15) versehen, getrocknet und verpackt wird und
30 daß das so präparierte Substrat (3) sodann zu einem von dem Herstellungsort entfernten Anwendungsort gebracht wird, an dem die

- 30 -

Meßprobe von einem Anwender in Kontakt mit den Nachweisfeldern (5, 7) gebracht wird.

15) 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Analyten durch eine Detektion einer Änderung der optischen Eigenschaften der Nachweisfelder erfolgt.

16) 18. Verfahren nach Anspruch ¹⁵ 17,
10 dadurch gekennzeichnet, daß die optische Änderung der Nachweisfelder durch Isotope, Enzyme, Fluorochrome, Farbstoffe, Metallkolloide oder/und Beads herbeigeführt wird.

17) 18. Verfahren nach Anspruch ¹⁶ 18,
15 dadurch gekennzeichnet, daß Latex-Beads, Kunststoff-Beads, Glas-Beads oder/und Metall-Beads verwendet werden.

18) 20. Meßträger ^{zur Verwendung bei dem} zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, ins-
besondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der
20 Ansprüche 1 bis ¹⁷ 18,
^{umfassend} gekennzeichnet durch ein scheibenförmiges, aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat (3), auf dem auf einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder (15) in einer Vielzahl von Nachweisfeldern (5, 7) immobilisiert sind, wobei die Nachweisfelder
25 (5, 7) längs mindestens einer Spirallinie (27) oder/und einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien verteilt auf dem Substrat (3) angeordnet sind, ^{gekennzeichnet durch eine [-] auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats flächig {-} aufzubringen der Reflexionsschicht (21).}

~~21. Meßträger nach Anspruch 20,~~
30 ~~dadurch gekennzeichnet, daß~~ über den Nachweisfeldern (5, 7) eine [nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern] 15,

- 31 -

~~7) flächig auf das Substrat (3) aufgebrachte Reflexionsschicht (21) angeordnet ist.~~

¹⁸
19) 22. Meßträger nach Anspruch 21,
5 dadurch gekennzeichnet, daß auf der Reflexionsschicht (21) eine Schutzschicht (25) flächig aufgebracht ist.

¹⁹
20) 23. Meßträger nach Anspruch 22,
10 dadurch gekennzeichnet, daß die Schutzschicht (25) aus einem Material auf Acrylbasis gefertigt ist.

^{einem der Ansprüche 18 bis 20,}
21) 24. Meßträger nach Anspruch 20 bis 23,
^{vor Aufbringung der Reflexionsschicht als}
dadurch gekennzeichnet, daß er als Handelsseinheit verpackt ist.
~~verpackte Handelsseinheit bereitgestellt ist.~~

²¹
15 22) 25. Meßträger nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet, daß er getrocknet verpackt ist.

23) 26. Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, bei dem
20 auf einem scheibenförmigen Substrat auf mindestens einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird,
^{wobei}
25 ~~dadurch gekennzeichnet, daß~~ die Nachweisfelder magnetisch ausgewertet werden und hierzu Binder oder die nachzuweisenden Analyten mit magnetischen oder/und magnetisierbaren Markern markiert werden und ~~daß~~ die Nachweisfelder längs einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien oder/und längs mindestens einer Spirallinie verteilt auf dem Substrat angeordnet werden, ~~gewünschtenfalls in Verbindung mit weiteren Merkmalen mindestens einer der Ansprüche 1 bis 25.~~

<< - >>.

GEAENDERTES BLATT

- 32 -

24) 27.

Verfahren nach Anspruch ²⁷26,

dadurch gekennzeichnet, daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern eine Fixierschicht auf die Nachweisfelder aufgebracht wird.

5

25) 28.

Verfahren nach Anspruch ²⁴27,

dadurch gekennzeichnet, daß die Fixierschicht flächig auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird.

10 26) 28.

Verfahren nach Anspruch ²⁴28 oder ²⁵29,

dadurch gekennzeichnet, daß für die Fixierschicht ein Material auf Polymerbasis verwendet wird.

~~30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29,~~

15

« dadurch gekennzeichnet, daß vor der Ausbildung der Nachweisfelder oder nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern eine magnetische oder/und magnetisierbare Partikel enthaltende Magnetschicht flächig ^{über} ^r ^z auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird. »

20

~~31. Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 19 und 26 bis 30, umfassend~~

a) einen mit immobilisierten Bindern (15) vorbereiteten Meßträger (3),

25

b) Reagenzien zur Durchführung des Nachweisverfahrens, insbesondere optisch oder/und magnetisch detektierbare Nachweisreagenzien, und

c) ggf. Wasch- oder/und Pufferlösungen.

30

32. Testkit nach Anspruch 31,

dadurch gekennzeichnet, daß der Meßträger (3) in getrockneter Form vorliegt.

- 33 -

¹⁸ 22
27) ~~23~~. Verwendung eines Meßträgers nach einem der Ansprüche ~~20~~ bis ~~25~~
in einem Immunoassay oder/und Nukleinsäurehybridisierungsassay
oder/und Lektin-Zucker-Assay oder/und Protein-Nukleinsäureassay.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 19503P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/00876	International filing date (day/month/year) 03 February 2000 (03.02.00)	Priority date (day/month/year) 03 February 1999 (03.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/543		
Applicant EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 35 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

RECEIVED
OCT 26 2001
TC 1700

Date of submission of the demand 07 July 2000 (07.07.00)	Date of completion of this report 15 May 2001 (15.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/00876

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages _____, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages 1-3, 3a-3b, 4-26, filed with the letter of 23 March 2001 (23.03.2001),
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-27, filed with the letter of 23 March 2001 (23.03.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/00876

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☒ complied with.
- ☐ not complied with for the following reasons:

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Documents **D1-D4** describe differently configured test supports in the form of CDs for the purposes of immunological analysis as well as methods for the production and the use thereof; see

- **D1**, Figures 1-3; page 2/line 22 to page 3/line 2; page 6/line 18 to page 7/line 13; page 7/lines 17-23; page 10/line 16 to page 11/line 20; page 12/lines 7-13 and page 14/lines 5-18;
- **D2**, page 5/last paragraph to page 6/second paragraph; page 7/second and last paragraphs; page 8/last paragraph to page 9/first paragraph; page 15/second paragraph to page 16/second paragraph; page 17/last paragraph to page 21/first paragraph;
- **D3**, page 9/lines 15-37; page 10/lines 32-37; page 20/line 27 to page 26/line 16; page 32/lines 17-27; page 62/lines 31-34; Claims 18-26, 31 and 33;
- **D4**, Figure 1 and page 4/line 1 to page 5/line 7 and Claims 1-18.

However, it appears that none of the citations

discloses or suggests the application of the reflector in the form of a reflective layer that is applied to the substrate (3) above the detection fields (5, 7) (Claims 1 and 18), or the application of a flat magnetic layer (Claim 23).

2. Claims 1-27 therefore meet the requirements of PCT Article 33(2) to (4).

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



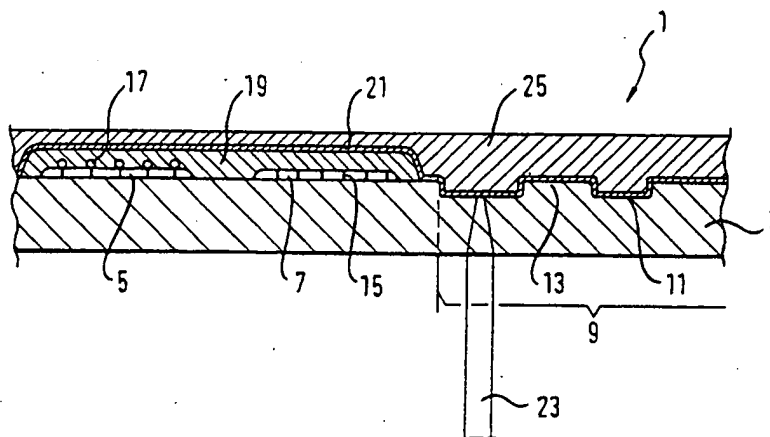
(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : <p style="text-align: center; font-weight: bold;">G01N 33/543</p>	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46600 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)					
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00876 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 2000 (03.02.00) (30) Prioritätsdaten: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">199 04 288.8</td> <td style="width: 33%;">3. Februar 1999 (03.02.99)</td> <td style="width: 33%;">DE</td> </tr> <tr> <td>199 38 839.3</td> <td>17. August 1999 (17.08.99)</td> <td>DE</td> </tr> </table> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL) (DE/DE); Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BECKER, Peter [DE/DE]; Schützenstrasse 1a, D-69123 Heidelberg (DE). HÖRBER, Heinrich [DE/DE]; Schichtlingsstrasse 3, D-91744 Weiltin-gen (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	199 04 288.8	3. Februar 1999 (03.02.99)	DE	199 38 839.3	17. August 1999 (17.08.99)	DE	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
199 04 288.8	3. Februar 1999 (03.02.99)	DE					
199 38 839.3	17. August 1999 (17.08.99)	DE					

(54) Title: METHOD OF DETECTING ANALYTES IN A SAMPLE AND SUPPORT FOR THIS PURPOSE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON ANALYTEN IN EINER MESSPROBE SOWIE MESSTRÄGER HIERFÜR

(57) Abstract

The invention relates to a method of detecting analytes in a sample. According to said method, analyte-specific binders (15) are immobilized on a plurality of detection fields (5, 7) on one of the planar faces of a disk-shaped substrate (3). The sample is contacted with said detection fields (5, 7) and the presence or/and the quantity of the analytes (17) to be detected is determined by optically evaluating the detection fields (5, 7). According to the invention, a substrate (3) is used that is produced from an optically transparent material. The detection fields (5, 7)



are arranged along at least one spiral line (27) distributed across the substrate (3). After the sample has been contacted with the detection fields (5, 7), a reflecting layer (21) is flatly applied on the substrate (3) on the planar face carrying the detection fields (5, 7). Alternatively, a magnetic read-out of the substrate can be made instead of the optical read-out.

(57) Zusammenfassung

Es wird eine Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Messprobe vorgeschlagen, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat (3) auf einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder (15) in einer Vielzahl von Nachweisfeldern (5, 7) immobilisiert werden, sodann die Messprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern (5, 7) gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten (17) durch optische Auswertung der Nachweisfelder (5, 7) ermittelt wird. Erfindungsgemäss wird ein aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat (3) verwendet, wobei die Nachweisfelder (5, 7) längs mindestens einer Spirallinie (27) verteilt auf dem Substrat (3) angeordnet werden. Nach Inkontaktbringung der Messprobe mit den Nachweisfeldern (5, 7) wird das Substrat (3) auf seiner die Nachweisfelder (5, 7) tragenden Flachseite flächig mit einer Reflexionsschicht (21) versehen. Alternativ ist statt der optischen Auslesung auch eine magnetische Auslesung des Substrats denkbar.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe sowie Meßträger hierfür

5

Beschreibung

Die Erfindung befaßt sich mit dem Nachweis von Analyten in einer Meßprobe. Als Analyten kommen beispielsweise Proteine, Peptide, Nukleinsäuren und deren Derivate sowie Moleküle, die an diesen binden
10 können, in Frage.

Als Meßprobe kommt jede Probe in Frage, von der vermutet wird, daß sie mindestens einen Teil der gesuchten Analyten enthält. Es kann sich dabei z. B. um eine Blutprobe, eine Serumprobe oder/und eine Urinprobe handeln,
15 oder allgemein um jede Lösung, die den gesuchten Analyten enthält.

Zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe ist der Einsatz sogenannter Bindungsassays bekannt. Bei solchen Bindungsassays werden im allgemeinen Analyten durch ihre spezifische Wechselwirkung mit Rezeptoren
20 nachgewiesen. Beispiele für solche Wechselwirkungen sind Protein/Protein-Wechselwirkungen, die beispielsweise während der Genexpression auftreten, Enzym/Substrat- oder Enzym/Effektor-Wechselwirkungen, die im Stoffwechsel auftreten, oder Protein/DNA- oder Protein/RNA-Wechselwirkungen während der Genexpression. Ein systematisches Verständnis dieser
25 molekularen Wechselwirkungen ist eine Grundvoraussetzung für das Verständnis aller biologischen Vorgänge sowohl in normalen als auch in erkrankten Zellen.

Weiterhin können mit Bindungsassays auch Nukleinsäuren nachgewiesen
30 werden. DNA/DNA-Wechselwirkungen spielen eine Hauptrolle in der Molekularbiologie, insbesondere bei der Identifizierung von Genen und bei Strategien zur Kartierung von DNA, beim Nachweis und der Quantifizierung

der Genexpression sowie bei der molekularen Diagnose oder Therapie von Erkrankungen. In Frage kommen selbstverständlich auch DNA/RNA- und RNA/RNA-Wechselwirkungen.

- 5 Aufgrund der großen Anzahl von Genen, Proteinen, chemischen Effektoren oder RNA-Aptameren erfordert ein Verstehen oder Eingreifen in biochemische Prozesse häufig die Erkennung, Quantifizierung oder Klassifizierung einer Vielzahl von molekularen Wechselwirkungen oder die Identifizierung von wirksamen Wechselwirkungspartnern aus einer großen Anzahl von
10 möglichen Kombinationen. Das Screening und Analysieren einer großen Anzahl von molekularen Wechselwirkungen ist bei den im Stand der Technik bekannten Verfahren jedoch häufig begrenzt.

- Meßproben sollen oftmals auf eine Vielzahl von Analyten hin untersucht
15 werden. Dabei ergibt sich das Problem, daß bei der Auswertung große Datenmengen anfallen. Um in der Praxis erfolgreich zu bestehen, muß die Auswertung jedoch in vertretbarer Zeit möglich sein. Bekannte Analysesysteme haben sich hier als nur bedingt zufriedenstellend erwiesen.

- 20 Aus einem Artikel "Metal Nano Clusters as Transducers for Bioaffinity Interactions" von Thomas Schalkhammer in Monatshefte für Chemie 000, 1-26, Springer-Verlag 1998, Seiten 1-26, ist ein Sensoraufbau für biorekognitive Bindungsvorgänge und katalytisch-enzymatische Prozesse bekannt, bei dem auf einem Polycarbonat-Substrat eine Spiegelschicht aus Silber und
25 darüber eine Abstandsschicht aus einem Polymermaterial angeordnet sind. Die Abstandsschicht dient ihrerseits als Träger für die darauf immobilisierten Binder. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von Metall-Clustern, mit denen die nachzuweisenden Analyten markiert werden und die in elektromagnetische Wechselwirkung mit der metallischen Spiegelschicht treten. In Sensorberei-
30 chen starker Überdeckung mit gebundenen Metall-Clustern wird Licht, das von der dem Polycarbonat-Substrat abgewandten Seite der Spiegelschicht her eingestrahlt wird, stärker absorbiert als in überdeckungsfreien oder

schwächer überdeckten Sensorbereichen, was die optische Auslesung des Sensors über Absorptionsmessungen ermöglicht.

5 Für die Funktion dieses bekannten Sensors ist die Dicke der Abstandsschicht ein entscheidender Parameter. Diese muß in einem vorgegebenen Bereich gewählt werden, der von der Wellenlänge des bei der späteren Auswertung eingestrahlten Lichts abhängt. Es muß insbesondere sichergestellt sein, daß die Abstandsschicht auf ihrer gesamten Ausdehnung eine gleichmäßige Dicke besitzt. Hierfür ist ein hoher herstellungstechnischer
10 Aufwand zu betreiben.

In dem angesprochenen Artikel werden für die optische Auswertung dieses Sensors schon Lesegeräte vorgeschlagen, die es erlauben, auch größere Datenmengen zu bewältigen, unter anderem CD-ROM-Lesegeräte.
15

Aufgabe der Erfindung ist es, einen Weg aufzuzeigen, wie mit geringem Aufwand, nicht nur was die datentechnische Auswertung anbelangt, sondern auch was die Bereitstellung des Sensors anbelangt, eine Meßprobe auf eine große Fülle von Analyten hin untersucht werden kann.
20

Bei der Lösung dieser Aufgabe geht die Erfindung nach einem ersten Aspekt von einem Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe aus, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert
25 werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch optische Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird.

30 Erfindungsgemäß ist hierbei vorgesehen, daß ein aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat verwendet wird, daß die Nachweisfelder längs mindestens einer Spirallinie oder/und einer Vielzahl

konzentrischer Kreislinien verteilt auf dem Substrat angeordnet werden und daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern ein optischer Reflektor der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats benachbart angeordnet wird.

5

Bei der Erfindung können die Nachweisfelder direkt auf dem Substrat ausgebildet werden. Hierbei kann es sich empfehlen, die Substratoberfläche zunächst chemisch vorzubehandeln oder durch Vorbehandlung mit einem Sauerstoffplasma eine Oberflächenmodifizierung zu bewirken. Diese
10 Modifikation kann das Aufbringen der Binder zur Ausbildung der analyt-spezifischen Nachweisfelder erleichtern. Unterhalb der Binder ist bei der Erfindung demnach keine Abstandsschicht mit einer präzise einzuhaltenden Dicke auf das Substrat aufzubringen, wie dies bei dem von Schalkhammer bekannten Sensor zwingend erforderlich ist. Insofern ergibt sich ein
15 reduzierter fertigungstechnischer Aufwand.

Der Reflektor wird für die optische Auswertung des Assays benötigt. Er kann von einer Reflexionsschicht gebildet werden, die nach Abschluß der molekularbiologischen Verfahrensschritte auf das Substrat über den
20 Nachweisfeldern aufgebracht wird. Aufgrund ihres guten Reflexionsvermögens empfehlen sich metallische Werkstoffe. Grundsätzlich sind auch andere Materialien denkbar, etwa Dielektrika. Bevorzugt wird die Reflexionsschicht aus Aluminium gebildet. Denkbar ist auch Silber als Material für die Reflexionsschicht. Die Reflexionsschicht kann durch chemisches Auf-
25 dampfen ausgebildet werden. Möglich ist aber auch, eine vorgefertigte reflektierende Folie auf das Substrat aufzukleben.

Alternativ ist es denkbar, daß der Reflektor im Abstand von dem Substrat angeordnet wird, er also nicht direkt auf das Substrat aufgebracht wird.
30 Beispielsweise kann der Reflektor von einer Spiegelplatte gebildet sein, die in einem Auswertegerät angebracht ist, welches zur Auswertung des Assays verwendet wird.

Die optische Transparenz des Substrats macht es zusammen mit dem auf der substratfernen Seite der Nachweisfelder angeordneten Reflektor möglich, zur optischen Auswertung dieses erfindungsgemäßen molekularbiologischen Sensors auf die Hardware handelsüblicher CD-Lesegeräte zurückzugreifen. Insbesondere bei spiraliger Anordnung der Nachweisfelder und bei Ausbildung des Reflektors als direkt auf das Substrat aufgebrachte Reflexionsschicht können solche handelsüblichen CD-Lesegeräte mit vergleichsweise geringem Aufwand so modifiziert werden, daß aus dem rückkehrenden Licht des die Nachweisfelder abtastenden Laserstrahls die gewünschten Informationen herausgefiltert werden können. Denkbar ist es, daß hierzu lediglich Software-Modifikationen erforderlich sind. Selbst bei kreisförmiger Anordnung der Nachweisfelder ist die Technik solcher CD-Lesegeräte grundsätzlich anwendbar, sofern die konstruktiven und softwaremäßigen Voraussetzungen für einen Sprung des die Nachweisfelder abtastenden Laserstrahls von Kreislinie zu Kreislinie geschaffen werden.

Besonders eignet sich ein CD-ROM-Lesegerät, das bei Einbettung in eine Computerarchitektur dem Anwender die Möglichkeit gibt, die Auswertesoftware selbst zu definieren.

Die Auswertung der Nachweisfelder kann abhängig vom gewählten Auswertelgorithmus quantitative wie auch qualitative Aussagen liefern. Mittels geeigneter Marker können die optischen Eigenschaften, insbesondere das Absorptionsverhalten, von Nachweisfeldern, in denen sich Analyten an Rezeptoren angeheftet haben, von Nachweisfeldern, an deren Rezeptoren sich keine Analyten angeheftet haben, unterscheidbar gemacht werden. Auf diese Weise ist es beispielsweise über Absorptionsmessungen möglich, diejenigen Nachweisfelder zu erkennen, die nach Abschluß der molekularbiologischen Verfahrensschritte Analyten tragen. Dies wäre zunächst eine rein qualitative Aussage. Will man darüber hinaus auch quantitative Aussagen treffen, so ist es denkbar, die Nachweisfelder mehrmals abzutasten und eine Schwelle, die bei der Auswertung als Entscheidungsgrenze zwischen

Vorhandensein und Nichtvorhandensein von Analyten genommen wird, von Abtastdurchgang zu Abtastdurchgang schrittweise zu verändern. Auf diese Weise können auch Aussagen über die Menge der in den einzelnen Nachweisfeldern hängengebliebenen Analyten getroffen werden.

5

Wenn der Assay mit einem ggf. geeignet angepaßten CD-ROM-Laufwerk ausgelesen wird, ermöglicht ein angeschlossener Computer dem Anwender die Weiterverarbeitung der von dem Laufwerk gelieferten Datenmenge, wobei er das Ergebnis dieser Weiterverarbeitung auf externen Datenspeichern abspeichern kann, beispielsweise um Datenbanken über Patienten zu erstellen. Zur Datenspeicherung können herkömmliche Standardspeicher, etwa Festplatten oder Floppy-Discs, verwendet werden. Mit Computerhilfe ist eine schnelle Auswertung der Datenflut des Laufwerks möglich. Die Kapazität herkömmlicher Computer und Speichersysteme ist in der Regel so
10 ausreichend, daß auch komplexe Genanalysen darauf durchgeführt werden können.

15

In der Regel wird es erwünscht sein, scharf definierte Nachweisfelder zu erhalten, die zusätzlich sehr klein sein sollen, um eine hinreichende Zahl von
20 Nachweisfeldern auf der Substratscheibe unterzubringen, die zweckmäßigerweise die Größe einer herkömmlichen CD (Compact Disc) besitzt. Wenn man davon ausgeht, daß der radiale Abstand zweier aufeinanderfolgender Spiralwindungen zweckmäßigerweise etwa $1,6 \mu\text{m}$ beträgt, so empfiehlt es sich, die Binder in Feldern aufzubringen, die radial nicht breiter als $1 \mu\text{m}$
25 sind, damit zwischen bezogen auf die Scheibenachse radial benachbarten Nachweisfeldern ein hinreichender Abstand besteht und jedes einzelne Nachweisfeld als solches orts aufgelöst werden kann. Bevorzugt sind die Nachweisfelder radial sogar schmaler als $1 \mu\text{m}$, wobei es zweckmäßig sein kann, sie mit einer radialen Breite auszubilden, die im wesentlichen der
30 Breite der bei herkömmlichen CDs eingepprägten Datenvertiefungen (sogenannte Pits) entspricht, nämlich etwa $0,5 \mu\text{m}$. Gleichfalls empfiehlt es sich, entlang der Spirallinie bzw. einer Kreislinie einander benachbarte

Nachweisfelder mit Abstand voneinander anzuordnen, um deren individuelle Auflösung durch das Auswertesystem zu ermöglichen. Die Nachweisfelder können als im wesentlichen quadratische oder kreisförmige Flächen ausgebildet werden. Denkbar ist auch, sie entsprechend der Gestalt der Datenpits herkömmlicher CDs in Umfangsrichtung, also in Spiral- bzw. Kreislinienrichtung, länglich auszubilden, etwa oval oder rechteckig.

Um die Binder unter den vorstehend skizzierten dimensionellen Randbedingungen für die Nachweisfelder auf das Substrat aufzubringen, eignen sich insbesondere Mikroprinttechniken, Tintenstrahltechniken oder Elektrospraytechniken. Zum Nachlesen, was Mikroprinttechniken anbelangt, wird beispielhaft verwiesen auf: "Microfabrication, Microstructures and Microsystems" von Dong Qin et al., "Topics In Current Chemistry", Band 194, 1998, Seite 6ff., Springer-Verlag. Bezüglich Tintenstrahltechniken wird beispielhaft verwiesen auf: "A new device for multifunctional dosage of liquids by a free jet" von N. Hey et al., Proceedings IEEE-Mems 1998, CH 36176. Elektrospraytechniken, insbesondere Nanoelektrospraytechniken, können beispielsweise in "Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source" von M. Wilm und M. Mann in Analytical Chemistry, Band 68, Nr. 1, 1. Januar 1996, Seiten 1-8, sowie in "Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?" von M. Wilm, M. Mann in International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 136 (1994), Seiten 167-180, nachgelesen werden. Diese Techniken ermöglichen es, die Nachweisfelder mit hoher Ortsauflösung gezielt mit vorbestimmten Bindern zu versehen. Die Binder können auf die Außenoberfläche der Substratscheibe aufgebracht werden. Denkbar ist es auch, in Analogie zu den Datenpits herkömmlicher CDs kleine Vertiefungen in die Außenoberfläche des Substrats einzubringen und darin die analytspezifischen Binder zu immobilisieren. Falls solche Vertiefungen für die Binder vorgesehen werden, wird es zweckmäßig sein, diese mit einer radialen Breite von etwa 0,5 μm auszubilden, entsprechend der Breite der Datenpits herkömmlicher CDs.

Um biologische Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu untersuchen, kommen als Analyten insbesondere Nukleinsäuren oder/und Proteine in Betracht. So kann das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, um Protein/Protein-Wechselwirkungen, wie sie beispielsweise während der Genexpression oder als Zellsignale auftreten, Enzym/Substrat- oder Enzym/Effekt-Wechselwirkungen während des Stoffwechsels oder Protein/DNA- oder Protein/RNA-Wechselwirkungen während der Genexpression nachzuweisen.

Durch geeignete Wahl der Binder in den Nachweisfeldern können auch DNA/DNA-Wechselwirkungen nachgewiesen werden, wie es insbesondere zur Genidentifizierung und zur Kartierung von Genen, beim Untersuchen und Quantifizieren der Genexpression sowie bei der molekularen Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen von Bedeutung ist.

Molekulare Wechselwirkungen und Enzymaktivitäten können durch die Bindung von RNA-Aptameren oder kleinen chemischen Verbindungen an Makromoleküle beeinflusst werden. Natürliche und synthetische Effek-
tormoleküle erlauben es deshalb häufig, biochemische Verfahren durch Modulation von oder Eingreifen in makromolekulare Wechselwirkungen zu manipulieren.

Bevorzugt handelt es sich bei dem Substratmaterial um ein nicht poröses Material. Die Verwendung eines nicht porösen Trägers ermöglicht das definierte Aufbringen auch kleiner Nachweisfelder, so daß eine Miniaturisierung des Testformats bzw. das Aufbringen einer Vielzahl von Nachweisfeldern möglich ist. Geeignete Materialien für das scheibenförmige Substrat sind z. B. Kunststoffe und Glas. Für CD-ROM-Laufwerksapplikationen handelt es sich bevorzugt um ein fokussierendes Material, insbesondere um Polycarbonat.

Die Immobilisierung der Binder an den Nachweisfeldern kann nach an sich bekannten Verfahren durchgeführt werden. Die Immobilisierungsstrategie hängt von der Art des zu immobilisierenden Moleküls und des jeweiligen Substrats ab. Im allgemeinen können Binder direkt an eine Matrix über eine chemische Reaktion gebunden werden, beispielsweise über eine spezielle Aminosäure in einem Protein (insbesondere Cystein oder Lysin) oder über das Phosphatgrundgerüst einer DNA. Die Immobilisierung kann auch mit bifunktionellen chemischen Quervernetzern oder über eine spezifische hochaffine Wechselwirkung, wie etwa die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung durchgeführt werden. Die analytspezifischen Binder können auf der Oberfläche auch adsorbiert werden, wobei eine kovalente Bindung jedoch bevorzugt ist. Als Binder werden auf die Oberfläche des Substrats Substanzen oder/und Moleküle aufgebracht, die in der Lage sind, den gewünschten Analyten spezifisch, insbesondere mit hoher Affinität, zu binden.

Nach Inkontaktbringen der Meßprobe mit den Nachweisfeldern wird das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch optische Auswertung der Nachweisfelder ermittelt. Hier können alle dem Fachmann bekannten Methoden herangezogen werden. Ein übliches Verfahren, um molekulare Wechselwirkungen zu analysieren, besteht aus mehreren Schritten: Ein erster Wechselwirkungspartner, z. B. ein analytspezifischer Binder oder Rezeptor, wird mit einem festen Träger kovalent oder adsorptiv verknüpft. Beim Inkontaktbringen der Meßprobe mit den Nachweisfeldern kann ein zweiter Wechselwirkungspartner, z. B. der Analyt, mit dem Rezeptor wechselwirken. Anschließend wird das Vorhandensein des Analyten (oder das Nichtvorhandensein in kompetitiven Testformaten) an der Stelle, an der der Rezeptor immobilisiert ist, nachgewiesen. Die Wechselwirkung zwischen den zwei Bindepartnern wird bevorzugt unter Bedingungen durchgeführt, bei denen beide Reaktanten in einer nativen, aktiven Konfiguration vorliegen, bevorzugt in einer flüssigen Reaktion. Besonders bevorzugt wird das Inkontaktbringen unter einem

annähernd physiologischen pH-Wert und bei ionischen Bedingungen durchgeführt.

Der Nachweis erfolgt beim erfindungsgemäßen Verfahren durch Detektion
5 einer Änderung der optischen Eigenschaften der Nachweisfelder. Die
optische Änderung der Nachweisfelder kann z. B. durch Isotope, Enzyme,
Fluorochrome, Farbstoffe, Metallkolloide, Beads oder ähnliches herbei-
geführt werden, die als Markersystem dienen. Zum Nachweis wird einer der
Wechselwirkungspartner, d. h. der Rezeptor oder der Analyt, direkt oder
10 indirekt markiert. Bevorzugt werden zur Detektion Proteine oder Nu-
kleinsäuren mit einer Biotineinheit derivatisiert, wonach eine Erkennung
durch Streptavidinkonjugate möglich ist.

Bevorzugt resultiert das Nachweisverfahren in der Präzipitation eines
15 Farbstoffs oder der Lokalisierung eines Fluorochroms an der Stelle der
molekularen Wechselwirkung oder in der Anlagerung von Metall-Clustern
mit starker elektromagnetischer Wechselwirkung. Latex-Beads oder
Kunststoff-Beads können ebenfalls angebunden werden. Sie bewirken
aufgrund ihres Brechungsverhaltens und ihrer gekrümmten (sphärischen)
20 Oberfläche eine Streuung des einfallenden Ausleselichts, die als Intensitäts-
minderung detektierbar ist. Bei geeigneter Dimensionierung der Beads
können Effekte der destruktiven Interferenz erzielt werden.

Die wechselwirkenden Moleküle, also der Rezeptor und der Analyt, können
25 entweder direkt über ihre spezifischen Bindestellen nachgewiesen werden
oder indirekt, indem sie mit einem Marker versehen werden, der eine
bekannte spezifische Bindestelle enthält. Beispiele für solche Marker sind
Epitope, für die monoklonale Antikörper bekannt sind, oder eine Biotingrup-
pe, die mit Streptavidin bindefähig ist. Daneben ist auch das direkte
30 spezifische Binden eines Antikörpers an den Analyten möglich. Antikörper
und Streptavidin werden bevorzugt mit einem Enzym konjugiert, um eine
Auswertung der Nachweisfelder zu ermöglichen. Beispiele für bevorzugte

Enzyme sind Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase und β -Galaktosidase. Bei Zugabe geeigneter Substrate läuft eine enzymatische chromogene Reaktion ab, wobei gefärbte Produkte entstehen, die an den Orten präzipitieren, an denen die Enzyme gebunden sind und somit das Vorhandensein des Analyten anzeigen. Geeignete Substrate der obigen Enzyme, die eine optische Auswertung ermöglichen, sind für Meerrettichperoxidase beispielsweise Diaminobenzidin (DAB), welches ein in Wasser und Ethanol unlösliches braunes Produkt ergibt, DAB + Metall, welches in Gegenwart von Kobalt oder Nickel ein graues bis schwarzes unlösliches Produkt ergibt, Chlornaphtol, das eine blau-schwarze, wasserlösliche Färbung ergibt, Aminoethylcarbazol, das ein rotes, wasserunlösliches Produkt ergibt. Bevorzugte Substrate für alkalische Phosphatase sind Naphthol-AS-BI-Phosphat/New-Fuchsin, was ein rotes, unlösliches Produkt ergibt, Bromchlorindolylphosphat/Nitrotetrazolium, was ein schwarz-violettes Präzipitat ergibt, und für β -Galaktosidase Bromchlorindolyl-b-D-Galaktpyranosid (BCIG), was ein unlösliches blaues Produkt ergibt. Der Nachweis der Analyten kann hier leicht durch optische Detektion des gefärbten Bereichs erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Wechselwirkungsstellen ist die Anfärbetechnik mit Goldkolloiden, wobei auch andere Typen von Metallclustern bzw. -Beads verwendet werden können. Hier sind insbesondere Silberteilchen vorteilhaft, die die Sensitivität eines optischen Nachweissystems aufgrund nichtlinearer optischer Effekte nahe einer Metalloberfläche der Reflexionsschicht erhöhen können. Weiterhin bevorzugt ist die Verwendung von Farbstoffen als Marker, insbesondere von gefärbten Latexpartikeln. Es können auch Glas-Beads aus Siliziumoxid verwendet werden, die mit einem Farbstoff in hoher Konzentration gefüllt sind.

Neben der Messung der Absorption ist bei Wahl geeigneter Marker, beispielsweise fluoreszierender Stoffe, auch eine Messung der Fluoreszenz möglich, wobei hier die Detektionswellenlänge eine andere als die einge-

strahlte Wellenlänge ist. Sofern marktgängige CD-Laufwerke, insbesondere CD-ROM-Laufwerke, bei der Auswertung herangezogen werden sollen, können im Fall von Fluoreszenzmessungen konstruktive Laufwerksmodifikationen neben einer entsprechenden Anpassung der Software erforderlich sein. Insbesondere kann es notwendig sein, einen speziell auf die Fluoreszenzwellenlänge abgestimmten Detektor einzubauen.

Die Erfindung ermöglicht es, auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats zusätzliche Informationen einzuschreiben, die zeitgleich mit den Nachweisfeldern ausgelesen und ausgewertet werden können. Demgemäß wird vorgeschlagen, daß auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats entlang der Spirallinie bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich Datenfelder ausgebildet werden, welche meßprobenbezogene oder/und nachweisfeldbezogene oder/und auswertungsbezogene Informationen enthalten. Bei den meßprobenbezogenen Informationen kann es sich beispielsweise um Informationen über Ort und Zeit der Gewinnung der Meßprobe, über die Art der Meßprobe oder über die Person handeln, der die Meßprobe entnommen wurde. Die nachweisfeldbezogenen Informationen können molekularbiologische oder biochemische Angaben über die Nachweisfelder enthalten, insbesondere über den Bindertyp der einzelnen Nachweisfelder. Die auswertungsbezogenen Informationen können Angaben über das zum Nachweis der Analyten angewendete Detektionsprinzip, etwa enzymatische Detektion, Detektion über Farbstoffe, Detektion über Metall-Cluster oder dergleichen, enthalten. Ferner können sie Angaben darüber enthalten, welches physikalische Abtastprinzip ein Lesegerät anwenden soll, etwa eine Absorptionsmessung oder eine Fluoreszenzmessung. Zudem können die auswertungsbezogenen Informationen dem Lesegerät Lage und Ort der Nachweisfelder auf dem Substrat angeben und ihm damit signalisieren, wann das Lesegerät von einer Software zum Lesen der Datenfelder auf eine Software zum Lesen der Nachweisfelder umschalten soll. Insbesondere ist denkbar, daß die auswertungsbezogenen Informationen schon zumindest Teile einer Auswerte-Software enthalten, die

vom Lesegerät bei der Auswertung der Nachweisfelder abgearbeitet wird. Auf diese Weise kann der Anwender von mühsamen Programmierungsaufgaben zur Softwareanpassung seines Computerarbeitsplatzes entlastet werden. Die vollständige Auswerte-Software kann bereits herstellerseitig,
5 soweit geeignete Software-Standards existieren, in den Sensor eingeschrieben werden.

Grundsätzlich ist es denkbar, die Nachweisfelder und die Datenfelder längs der Spirallinie getrennt anzuordnen. Es kann aber zweckmäßig sein,
10 Nachweisfelder und Datenfelder abwechselnd entlang der Spirallinie anzuordnen, beispielsweise in der Weise, daß einem einzelnen Nachweisfeld oder einer Gruppe von Nachweisfeldern ein Datenfeld zugeordnet wird, das dem Nachweisfeld bzw. der Gruppe von Nachweisfeldern längs der Spirallinie vorhergeht und dem Auswertesystem Informationen über dieses
15 Nachweisfeld bzw. diese Gruppe von Nachweisfeldern liefert.

Sofern die Nachweisfelder längs konzentrischer Kreislinien angeordnet werden, können Nachweisfelder und Datenfelder ebenfalls abwechselnd entlang mindestens einer Kreislinie angeordnet werden. Denkbar ist aber
20 auch, daß Nachweisfelder und Datenfelder jeweils auf gesonderten Kreislinien ausgebildet werden.

Die Datenfelder sollen zweckmäßigerweise von der gleichen Seite der Substratscheibe her ausgelesen werden können wie die Nachweisfelder.
25 Dabei besteht eine Möglichkeit darin, zur Bildung der Datenfelder Vertiefungen in die Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats einzubringen, wobei der Reflektor so angebracht wird, daß er in die Vertiefung hineinreicht. Zweckmäßigerweise erfolgen die Codierung der Daten und die Anordnung der Vertiefungen nach Maßgabe eines gängigen
30 CD-Formats, insbesondere des CD-ROM-Formats, so daß die Datenfelder mittels herkömmlicher CD-Laufwerke ohne Softwaremodifikationen gelesen werden können.

Es ist sogar denkbar, zur Bildung der Datenfelder auf Vertiefungen zu verzichten. Durch Anbindung von optisch absorbierenden oder streuenden Substanzen an das Substrat kann ebenfalls Einfluß auf die Reflexion des zur Auslesung auf die Nachweis- und Datenfelder gerichteten Lichtstrahls
5 genommen werden. So ist es denkbar, bei geeigneter Wahl von Metall- oder Kunststoff-Beads ähnliche Effekte destruktiver Interferenz zu erzielen, wie sie auch durch Vertiefungen in der Substratoberfläche erreicht werden. Es kann daher vorgesehen sein, daß zur Bildung der Datenfelder eine einfallendes Leselicht beeinflussende Substanz auf die die Nachweisfelder
10 tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird.

Weil bei Ausbildung des Reflektors als auf das Substrat aufgebrachte Reflexionsschicht die letztere erst nach Abschluß sämtlicher molekularbiologischer oder biochemischer Analyseschritte aufgebracht wird, sind Vorher-
15 Nachher-Messungen der Nachweisfelder nicht möglich, also Messungen vor und nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern. Um dennoch aus den Meßsignalen verlässliche Aussagen darüber zu gewinnen, ob und welche Nachweisfelder mit Analyten besetzt sind, kann es vorteilhaft sein, auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des
20 Substrats entlang der Spirallinie bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich mindestens ein Referenzfeld auszubilden, dessen optische Eigenschaften als Referenz bei der Auswertung der Nachweisfelder verwendet werden. Beispielsweise können diese Referenzfelder einen bekannten, für analytfreie Nachweisfelder typischen Referenzabsorptionsgrad für das Licht des
25 abtastenden Lichtstrahls besitzen, der von einem Absorptionsgrad unterscheidbar ist, den analytbehaftete Nachweisfelder typischerweise besitzen. Daneben können auch Referenzfelder ausgebildet sein, die den Analyten oder/und Marker enthalten und die bei korrekter Durchführung des Verfahrens als positive Kontrolle dienen. Die Referenzfelder können zudem
30 zur Kalibrierung und zur Quantifizierung der Messungen herangezogen werden.

Im Bereich der Nachweisfelder kann sich eine verminderte Haftung der Reflexionsschicht einstellen, wenn diese unmittelbar auf die darunterliegende molekularbiologische oder biochemische Ebene aufgebracht wird. In diesem Fall kann es günstig sein, nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern zunächst eine Deckschicht aus einem optisch transparenten Material auf die Nachweisfelder aufzubringen, bevor die Reflexionsschicht aufgebracht wird. Die Deckschicht kann auch zur Fixierung der Reagenzien in den Nachweisfeldern dienen. Das Material und die Dicke der Deckschicht wird man so aufeinander abstimmen, daß eine Beeinflussung der optischen Eigenschaften des Sensors durch die Deckschicht, etwa durch Fokussierungs- oder Absorptionseffekte, nicht oder zumindest in beherrschbarer Weise erfolgt. Ein Material auf Polymerbasis hat sich für die Deckschicht als geeignet gezeigt. Sie kann z. B. als Folie oder mittels eines Sprühverfahrens aufgebracht werden. Sofern der Sensor auch Vertiefungen in Datenfeldern aufweist, wird man sicherstellen müssen, daß die Vertiefungen nicht durch das Material der Deckschicht wieder aufgefüllt werden, um einen Verlust der durch die Vertiefungen repräsentierten Dateninformationen zu vermeiden. Sprühverfahren sind zur lokalen Aufbringung der Deckschicht denkbar. Vorstellbar ist es auch, die Oberfläche der Substratscheibe gedanklich in Segmente, etwa Kreissektoren, aufzuteilen, von denen ein Teil ausschließlich für Nachweisfelder und ein anderer Teil ausschließlich für Datenfelder reserviert wird. Die Segmente mit Datenfeldern können dann sehr leicht von der Deckschicht freigehalten werden.

25

Das Substrat mit den darauf immobilisierten Bindern kann als handelbare Einheit verpackt und an Anwender verschickt werden. Denkbar ist es, daß der Hersteller einen kundenspezifischen Satz von Bindern zusammenstellt und auf das Substrat aufbringt. Vorstellbar ist auch, kundenunspezifisch, aber applikationsspezifisch, beispielsweise für bestimmte Genanalysen, einen Satz von Bindern auf ein Substrat aufzubringen und dieses als vorbereiteten Meßträger anzubieten. Es empfiehlt sich, diesen Meßträger zu

30

trocknen, bevor er verpackt und verschickt wird. Die zu untersuchende Meßprobe wird dann vom Anwender, also vom Käufer des Meßträgers, aufgebracht. Gleiches kann auch für markerenthaltende Reagenzien gelten. Die Aufbringung der Reflexionsschicht und ggf. der Deckschicht nach
5 Abschluß des molekularbiologischen bzw. biochemischen Nachweisverfahrens, das auch Waschschriffe umfassen kann, kann beim Anwender erfolgen, sofern diesem hierfür geeignete Geräte zur Verfügung stehen. Denkbar ist auch, daß der Anwender den analytbehafteten Meßträger zum Hersteller oder zu einem anderen Labor zurücksendet, wo diese Schichten
10 aufgebracht werden.

Auf der Reflexionsschicht kann noch eine Schutzschicht flächig aufgebracht werden, wobei sich wegen seiner Schlag- und Kratzfestigkeit ein Material auf Acrylbasis eignet. Der so geschützte Meßträger kann über lange
15 Zeiträume hinweg aufbewahrt werden und jederzeit wieder ausgelesen werden.

Die Erfindung betrifft ferner einen Meßträger zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, der sich insbesondere zur Durchführung des vorstehend erläuterten Verfahrens eignet.
20

Nach einem anderen Aspekt geht die Erfindung zur Lösung der eingangs gestellten Aufgabe von einem Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe aus, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf
25 mindestens einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird. Erfindungsgemäß ist hierbei vorgesehen,
30 daß die Nachweisfelder magnetisch ausgewertet werden und hierzu Binder oder die nachzuweisenden Analyten mit magnetischen oder/und magnetisierbaren Markern markiert werden und daß die Nachweisfelder längs einer

Vielzahl konzentrischer Kreislinien oder/und längs mindestens einer Spirallinie verteilt auf dem Substrat angeordnet werden.

Die kreis- oder spiralförmige Verteilung der Nachweisfelder auf dem Substrat
5 ermöglicht die Verwendung marktgängiger Magnetplatten-Lesegeräte, sogenannter Hard-Disc-Laufwerke. Gegebenenfalls wird eine softwaremäßige Adaption der Laufwerkssteuerung notwendig sein. Die magnetische Auslesung der Nachweisfelder ermöglicht es sogar, auf beiden Flachseiten des Substrats Nachweisfelder auszubilden, so daß sich die Packungsdichte
10 der Sensoren mit Nachweisfeldern weiter erhöhen läßt. Hinsichtlich der gegenseitigen Abstände, der Größe und der Anordnung der Nachweisfelder sowie etwaiger Daten- und Referenzfelder auf dem Substrat treffen im wesentlichen die Angaben zu, die zuvor für den optisch auslesbaren Sensor gemacht wurden.

15 Um zu verhindern, daß die Marker durch Kontakt mit einem Lesekopf des Auswertegeräts vom Substrat weggerissen werden, kann nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern eine Fixierschicht auf die Nachweisfelder aufgebracht werden. Diese wird man zweckmäßigerweise
20 flächig auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufbringen. Für die Fixierschicht hat sich ein Material auf Polymerbasis als geeignet erwiesen.

Darüber hinaus kann vor der Ausbildung der Nachweisfelder oder nach
25 Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern eine magnetische oder/und magnetisierbare Partikel enthaltende Magnetschicht flächig auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht werden. Die Magnetschicht ermöglicht es, zusätzlich Daten in den Sensor einzuschreiben, die zusammen mit den Nachweisfeldern ausgelesen werden
30 können. Die magnetischen Eigenschaften der Magnetschicht wird man so wählen, daß die durch die Marker hervorgerufenen lokalen Schwankungen der magnetischen Feldstärke oder der magnetischen Flußdichte nicht infolge

der Magnetschicht "verschwimmen" und undetektierbar werden. Zwar ist es grundsätzlich denkbar, daß die Magnetschicht unterhalb der molekularbiologischen oder biochemischen Schicht des Sensors unmittelbar auf das Substrat aufgebracht wird. Zweckmäßig ist es jedoch, sie erst nach
5 Abschluß der molekularbiologischen oder biochemischen Verfahrensschritte aufzubringen, da sie so zugleich als Fixierschicht dienen kann.

Die Erfindung betrifft ferner ein Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach dem vorstehend beschriebenen ersten oder zweiten Aspekt. Das
10 Testkit umfaßt dabei einen mit immobilisierten Bindern vorbereiteten Meßträger, Reagenzien zur Durchführung des Nachweisverfahrens, insbesondere optisch oder/und magnetisch detektierbare Nachweisreagenzien, sowie ggf. Wasch- oder/und Pufferlösungen. Der Meßträger liegt bevorzugt in getrockneter Form vor.

15 Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung eines Meßträgers der vorstehend beschriebenen Art in einem Immunoassay oder/und Nukleinsäurehybridisierungsassay oder/und Lektin-Zucker-Assay oder/und Protein-Nukleinsäure-Assay.

20 Die Erfindung wird im folgenden anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Es stellen dar:

Fig. 1 eine schematische Schnittdarstellung eines erfindungsgemäßen
25 molekularbiologischen oder biochemischen Sensors ("Biosensor") mit Nachweis- und Datenfeldern und

Fig. 2 schematisch die Verteilung der Nachweis- und Datenfelder auf dem Biosensor.

30 In Fig. 1, die die realen Größenverhältnisse nicht getreu wiedergibt, ist der Biosensor allgemein mit 1 bezeichnet. Er besitzt die Form einer Kreisscheibe. Seine Größe entspricht zweckmäßigerweise der einer herkömmlichen

Compact Disc, deren Durchmesser üblicherweise etwa 12 cm beträgt. Der Biosensor 1 umfaßt ein Trägersubstrat 3, das aus einem optisch transparenten Material, vorzugsweise Polycarbonat, gefertigt ist. Auf der in Fig. 1 oberen Flachseite des Substrats 3 sind Nachweisfelder 5, 7 sowie Datenfelder 9 ausgebildet. In den Datenfeldern 9 sind Informationen über die Meßprobe oder/und über die Nachweisfelder oder/und über die Auswertung niedergelegt. Wie bei herkömmlichen CDs sind die Informationen in den Datenfeldern 9 durch abwechselnde vertiefte Bereiche 11 und nicht vertiefte Bereiche 13 des Substrats 3 repräsentiert.

In den Nachweisfeldern 5, 7 sind analytspezifische Binder bzw. Rezeptoren immobilisiert. Diese Binder sind in Fig. 1 schematisch durch kurze Striche 15 symbolisiert. Jedes Nachweisfeld 5, 7 trägt eine Vielzahl von Bindern 15 gleichen oder unterschiedlichen Typs. Das Nachweisfeld 7 repräsentiert in Fig. 1 ein Nachweisfeld, an dem nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern 5, 7 keine Analyten haftengeblieben sind. Dagegen repräsentiert das Nachweisfeld 5 ein Nachweisfeld, an dem Analyten haftengeblieben sind. Diese Analyten sind in Fig. 1 schematisch durch kleine Kreise 17 dargestellt, die zugleich die Marker symbolisieren, anhand deren die optische Detektion des Vorhandenseins der Analyten möglich ist.

Die Nachweisfelder 5, 7 sind in eine Deckschicht 19 eingebettet, die nur in den die Nachweisfelder 5, 7 tragenden Bereichen des Substrats 3 aufgebracht ist, nicht jedoch in den die Datenfelder 9 tragenden Bereichen des Substrats 3. Die Deckschicht 19 besteht ebenfalls aus einem optisch transparenten Material, vorzugsweise einem Polymermaterial. Sie fixiert die Marker auf dem Substrat 3 und dient zugleich als Haftvermittler zwischen dem Substrat 3 und einer Reflexionsschicht 21, die flächig auf das Substrat 3 aufgebracht ist, über sämtliche Nachweisfelder 5, 7 und sämtliche Datenfelder 9 hinwegreicht und in die Vertiefungen 11 der Datenfelder 9 hineinreicht. Die Reflexionsschicht 21 besteht vorzugsweise aus Aluminium, kann aber beispielsweise auch aus Silber bestehen und wird zweckmäßiger-

weise durch chemisches Aufdampfen erzeugt. Die Reflexionsschicht 21 dient als Reflektor für das Licht eines Laserstrahls 23, der von der Unterseite des Substrats 3 her zur Auslesung der Nachweisfelder 5, 7 und der Datenfelder 9 auf den Biosensor 1 gerichtet wird. Das reflektierte Licht
5 wird mittels gängiger Methoden ausgewertet. Beispielsweise wird es mittels eines Polarisationsfilters von dem eingestrahlteten Licht getrennt und sodann auf seine Intensität hin ausgewertet. Das Material des Substrats 3 hat vorteilhafterweise einen solchen Brechungsindex, daß der Laserstrahl 23 auf seinem Hinweg im Substrat 3 fokussiert wird, so daß der letztlich auf die
10 Nachweisfelder 5, 7 und die Datenfelder 9 einfallende Lichtfleck sehr klein gehalten werden kann.

Zur Oberseite hin ist der Biosensor 1 durch eine flächig aufgebrachte Deckschicht 25 abgeschlossen, die den Biosensor 1 vor schädlichen
15 chemischen oder mechanischen Einflüssen schützt. Vorzugsweise besteht sie aus einem Acrylmaterial.

Die Nachweisfelder 5, 7 und die Datenfelder 9 sind in abwechselnder Reihenfolge längs einer Spirallinie auf dem Substrat 3 angeordnet. Fig. 2
20 zeigt einen Ausschnitt zweier aufeinanderfolgender Windungen der Spirallinie. Letztere ist in Fig. 2 als gestrichelte Linie dargestellt und mit 27 bezeichnet. Mit d ist ferner der radiale Abstand zwischen den beiden Windungen, also die Spiralsteigung, bezeichnet. Er beträgt beispielsweise etwa $1,6 \mu\text{m}$. Die Vertiefungen 11, die bei Anwendung der für CDs,
25 insbesondere CD-ROMs, gängigen Codierung abgestuft variable Umfangslänge besitzen können, sind beispielsweise etwa $0,5 \mu\text{m}$ in radialer Richtung breit. Um radiale Überlappungen mit den Nachweis- oder Datenfeldern benachbarter Spiralwindungen zu vermeiden, sind die Nachweisfelder 5, 7 ebenfalls radial so schmal ausgebildet, daß ein hinreichender Abstand zu
30 den Feldern der benachbarten Spiralwindungen besteht. Insbesondere können die Nachweisfelder 5, 7 gleichfalls etwa $0,5 \mu\text{m}$ breit sein. Bei derartiger Bemessung kann ohne weiteres auch das "Ausfransen" in Kauf

genommen werden, das bei enzymatischem Nachweis der in den Nachweisfeldern 5 anhaftenden Analyten häufig zu beobachten ist. In Umfangsrichtung können die Nachweisfelder 5, 7 länglich sein, so daß sie mit einer hinreichend großen Gesamtfläche ausgebildet werden können. Auch in
5 Umfangrichtung werden die Nachweisfelder 5, 7 hinreichenden Abstand voneinander und von den Datenfeldern 9 aufweisen.

Die vorstehenden Maßangaben empfehlen sich insbesondere, wenn zur Auslesung der Daten- und Nachweisfelder CD-Laufwerke mit einem
10 Fleckdurchmesser des Laserstrahls 23 von etwa $2\text{ }\mu\text{m}$ verwendet werden.

Nachfolgend werden noch einige molekularbiologische oder biochemische Anwendungsbeispiele der Erfindung erläutert.

15 Beispiel 1

Anwendungen

Die Anwendungen können gemäß der Natur des immobilisierten Bindepartners (A), des analytspezifischen Binders, und der Natur seines "Liganden", d. h. des Analyten (B), klassifiziert werden. Als Wechselwirkungspartner
20 werden bevorzugt Nukleinsäuren und/oder Proteine verwendet, es können jedoch auch andere Partner von spezifischen Bindepartnern, wie etwa Lektine oder Zucker eingesetzt werden.

Bevorzugt werden die Rezeptoren bzw. Analyte, insbesondere Proteine und
25 Nukleinsäuren, mit einer Biotingruppe derivatisiert, wobei die Biotingruppe dann vorteilhaft mit einem Streptavidin-Enzymconjugat, wie etwa Meerrettichperoxidase, nachgewiesen wird. Das Substrat der Enzymreaktion wird derart ausgewählt, daß sich an der Stelle der molekularen Wechselwirkung ein intensives, dunkles Präzipitat bildet, das den Detektionslaser quentscht.
30 Daneben kann der Nachweis auch durch direkte Derivatisierung eines Wechselwirkungspartners mit einem Fluorochrom in Kombination mit einem geeigneten Laser erfolgen.

Beispiel 1.1

Der Rezeptor (A) ist ein RNA-Aptamer, ein Peptid oder ein natürliches oder synthetisches Effektormolekül und der Analyt (B) ist ein Protein.

- 5 Die Eigenschaften eines Enzyms oder Regulationsfaktors bei der Gen-expression werden häufig durch die Assoziation kleiner Effektor- oder Ligandmoleküle moduliert. Ein Beispiel sind Hormonrezeptoren, die nach Bindung an das Hormon in eine aktive Konformation überführt werden. Die Proteinfunktion kann durch Wechselwirkung eines Substratanalogons oder
- 10 durch allosterische Effektoren moduliert werden. Um geeignete kleine Chemikalien zu identifizieren, werden Screening-Verfahren für Liganden durchgeführt, wobei eine große Anzahl an verschiedenen Chemikalien untersucht wird.
- 15 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, chemische Bibliotheken durchzutesten. Dabei wird eine Vielzahl von verschiedenen kleinen Chemikalien in einer definierten Ordnung auf dem Meßträger immobilisiert, wobei das fragliche Protein unter verschiedenen Stringentbedingungen damit in Kontakt gebracht wird. Gebundenes Protein wird, wenn es mit
- 20 einem geeigneten Fluorochrom, beispielsweise einem Latexpartikel, markiert ist, direkt nachgewiesen oder indirekt unter Verwendung einer Enzym-amplifikationskaskade. In entsprechender Weise können große Bibliotheken von RNA-Aptameren oder Peptidengescree werden, entweder isoliert oder in ein Fusionsprotein eingebunden, hinsichtlich Wechselwirkungen mit einem
- 25 in Frage stehenden Protein.

Beispiel 1.2

Der Rezeptor (A) ist ein Protein und der Analyt (B) ist eine Nukleinsäure oder ein Ligant.

30

Proteinbibliotheken können hinsichtlich bestimmter Bindeeigenschaften, z. B. der Wechselwirkung mit einer definierten DNA-Sequenz gescreent

werden. Vervielfältigte Meßträger, die definierte Bereiche von Proteinen enthalten, die zusammen die Produkte einer cDNA-Expressionsbibliothek darstellen, können mit spezifischen Liganten oder DNA-Bindestellen charakterisiert werden. Die angeordneten Proteine können so, wie sie in der
5 Bibliothek sind, unbekannt sein und erst durch das erfindungsgemäße Verfahren zugeordnet werden. Alternativ können Bereiche von bekannten Proteinen oder Derivate eines definierten Proteins, wie etwa das Produkt einer zufälligen Mutagenese, untersucht werden.

10 Beispiel 1.3

Der Rezeptor (A) ist eine DNA oder RNA und der Analyt (B) ist ein Protein.

Eine große Anzahl von verschiedenen doppelsträngigen DNA-Fragmenten kann auf den Nachweisfeldern aufgebracht werden. Dabei kann es sich
15 entweder um kleine Fragmente, beispielsweise um Oligonukleotide oder um größere DNA-Fragmente bis zu sehr großen DNA-Abschnitten handeln, die eine geordnete Bibliothek von genomischen DNA-Fragmenten darstellen. Die Anwendungen umfassen die systematische Suche nach möglichen genomischen Bindestellen für DNA-Bindeproteine, aber auch andere DNA-
20 Bindemoleküle können nachgewiesen werden, wie etwa Interkalatoren, kleine Moleküle mit Bevorzugung bestimmter Sequenzen, PNAs und Sequenzen, die eine Trippelhelix bilden. Ebenso können als Rezeptormoleküle in den Nachweisfeldern RNA-Moleküle aufgebracht werden, wie etwa die Transskripte einer cDNA-Bibliothek oder die Derivate einer definierten
25 RNA, wie etwa das Produkt einer zufälligen Mutagenese.

Beispiel 2

Nukleinsäureuntersuchungen

30 Der Rezeptor (A) ist eine einzelsträngige DNA und der Analyt (B) ist eine einzelsträngige DNA oder RNA.

- 24 -

Beispiel 2.1

DNA-Kartierung

Es ist inzwischen möglich, ganze Genome zu sequenzieren und die Genome von höheren Eukarionten, wie etwa Menschen, Mäusen und Fliegen, werden kartiert und durch geordnete Klone (wie etwa P1-Phagenklone) abgedeckt, wobei davon ausgegangen wird, daß die Sequenzen aller Genome in absehbarer Zeit erhältlich sind. Hier können erfindungsgemäße Meßträger hergestellt werden, die ganze Genome in geordneten Arrays oder Bereichen enthalten. Damit ist es möglich, ein kloniertes Stück DNA in einem einzigen Hybridisierungsschritt seiner genomischen Lokalisierung zuzuordnen und abhängig von der Auflösung des Arrays (welche eine Funktion der mittleren Sequenzlänge und der Zahl an einzelnen DNA-Molekülen ist) sogar das Gen selbst zu identifizieren. Ein Beispiel einer solchen Anwendung sind die P1-Arrays von Genome Systems, welche bisher schlecht zu screenen sind, da sie nur auf Membranen erhältlich sind. Ein Aufbringen dieser P1-Arrays auf den erfindungsgemäßen Meßträgern ermöglicht eine einfache und unkomplizierte Anwendung. Translokationen und andere genomische Umordnungen, die häufige Ursache genetischer Erkrankungen sind, können ebenfalls auf einfache Weise kartiert werden, einschließlich Deletionen des mitochondrialen Genoms. Darüber hinaus können Insertionen von Transgenen leicht kartiert werden, wenn die insertierte DNA zusammen mit einer kleinen Menge an flankierender genomischer DNA nachgewiesen wird.

Beispiel 2.2

Genidentifizierung und/oder Genklonen

Arrays oder Bereiche von diagnostischen Oligonukleotiden, die alle bekannten Gene einer gegebenen Spezies darstellen, ermöglichen die direkte Identifizierung eines in Frage stehenden Gens. Hierzu können z. B. cDNA-Arrays von Klontech oder die DNA-Chips von Affimetrix, auf denen alle Hefegene aufgetragen sind, durch Übertragung auf die erfindungsgemäßen Meßträger verbessert werden.

Beispiel 2.3

Expressions-Profiluntersuchungen

Durch Aufbringen von DNA auf erfindungsgemäße Meßträger, die alle Gene eines Organismus zeigen, kann das Expressionsprofil untersucht werden.

5 Auf den Meßträger wird ein komplexes Gemisch von RNA aufgebracht, die den Expressionszustand einer bestimmten Zelle darstellen oder eine davon abgeleitete cDNA-Population. Der auf dem Meßträger festgestellte Expressionszustand kann leicht mit dem Expressionszustand anderer Zellen verglichen werden, die von anderen Gewebe stammen, andere Entwicklungsstadien oder andere Stoffwechselstadien darstellen. Alternativ können

10 DNA-Proben untersucht werden, die bestimmte ausgewählte DNA-Zustände darstellen, wie etwa Zellzyklusgene, Signalübermittlerkomponenten usw. Da die erfindungsgemäßen Meßträger über lange Zeit gelagert werden können, können Expressionsprofile erstellt werden, die archiviert und zu Vergleichszwecken herangezogen werden können.

15

Beispiel 2.4

Molekulare Diagnose von DNA-Polymorphismen

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Diagnose von üblichen und

20 seltenen DNA-Polymorphismen verwendet werden, einschließlich der Kartierung von Mutationen in Proto-Onkogenen, die übliche Tumore hervorrufen. Ein geeigneter Meßträger enthält überlagernde Oligonukleotide, die zusammen ein gesamtes Gen (z. B. die Wildtypsequenz) umfassen, zusammen mit Oligonukleotiden, die alle möglichen oder häufig auftretende

25 Mutationen dieser Sequenz enthalten. Das entsprechende DNA-Fragment wird von Patienten durch PCR isoliert und an den relevanten Gen-Meßträger unter Bedingungen hybridisiert, unter denen die Hybridisierung nur bei einer perfekten Sequenzübereinstimmung stattfindet. Ein Vergleich der Hybridisierung der experimentellen DNA an Wildtyp- bzw. Mutantoligonukleotide

30 ermöglicht es, exakt festzustellen, welche Art von Mutation in einer Sequenz auftritt.

Beispiel 3

Neben den oben beschriebenen Anwendungen, bei denen ein einfacher Bindevorgang nachgewiesen wird, der Signale ergibt, die ggf. durch eine Enzymkaskade verstärkt werden können, um die Sensitivität der Detektion zu erhöhen, kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Anwendungen verwendet werden, die umfangreichere Behandlungen des Meßträgers erfordern, wie etwa eine PCR-Amplifizierung, die analog zu in situ PCR-Amplifikationen durchgeführt wird. Auf diese Weise können auch infizierende Mittel nachgewiesen werden.

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, bei dem
5 auf einem scheibenförmigen Substrat (3) auf einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder (15) in einer Vielzahl von Nachweisfeldern (5, 7) immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern (5, 7) gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten (17)
10 durch optische Auswertung der Nachweisfelder (5, 7) ermittelt wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat (3) verwendet wird, daß die Nachweisfelder (5, 7) längs mindestens einer Spirallinie (27) oder/und längs einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien verteilt auf dem Substrat (3)
15 angeordnet werden und daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern (5, 7) ein optischer Reflektor (21) der die Nachweisfelder (5, 7) tragenden Flachseite des Substrats (3) benachbart angeordnet wird.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Reflektor von einer Reflexionsschicht (21) gebildet wird, welche auf das Substrat (3) über den Nachweisfeldern (5, 7) aufgebracht wird.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reflexionsschicht (21) aus Aluminium gebildet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1,
30 dadurch gekennzeichnet, daß der Reflektor im Abstand von dem Substrat angeordnet wird.

- 28 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß bezogen auf die Scheibenachse radial
benachbarte Nachweisfelder (5, 7) mit radialem Abstand voneinander
angeordnet werden.
5
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, daß entlang der Spirallinie (27) bzw. einer
Kreislinie einander benachbarte Nachweisfelder (5, 7) mit Abstand
voneinander angeordnet werden.
10
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß auf der die Nachweisfelder (5, 7)
tragenden Flachseite des Substrats (3) entlang der Spirallinie (27)
bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich Datenfelder (9) ausgebil-
15 det werden, welche meßprobenbezogene oder/und nachweisfeldbezo-
gene oder/und auswertungsbezogene Informationen enthalten.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, daß Nachweisfelder (5, 7) und Datenfelder
20 (9) abwechselnd entlang der Spirallinie (27) bzw. mindestens einer
Kreislinie angeordnet werden.
9. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, daß Nachweisfelder und Datenfelder jeweils
25 auf gesonderten Kreislinien ausgebildet werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung der Datenfelder (9)
Vertiefungen (11) in die die Nachweisfelder (5, 7) tragende Flachseite
des Substrats (3) eingebracht werden und daß der Reflektor (21) so
30 angebracht wird, daß er in die Vertiefungen (11) hineinreicht.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung der Datenfelder eine
einfallendes Leselicht beeinflussende Substanz auf die die Nachweis-
felder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird.
- 5
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, daß auf der die Nachweisfelder (5, 7)
tragenden Flachseite des Substrats (3) entlang der Spirallinie (27)
bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich mindestens ein Referenz-
10 feld ausgebildet wird, dessen optische Eigenschaften als Referenz bei
der Auswertung der Nachweisfelder (5, 7) verwendet werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet, daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe
15 mit den Nachweisfeldern (5, 7), unterhalb des Reflektors eine
Deckschicht (19) aus einem optisch transparenten Material auf die
Nachweisfelder (5, 7) aufgebracht wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13,
20 dadurch gekennzeichnet, daß für die Deckschicht (19) ein Material
auf Polymerbasis verwendet wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, daß ein Substrat (3) aus Polycarbonat
25 verwendet wird.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (3) an einem Herstellungs-
ort mit den Bindern (15) versehen, getrocknet und verpackt wird und
30 daß das so präparierte Substrat (3) sodann zu einem von dem
Herstellungsort entfernten Anwendungsort gebracht wird, an dem die

- 30 -

Meßprobe von einem Anwender in Kontakt mit den Nachweisfeldern (5, 7) gebracht wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Analyten durch eine Detektion einer Änderung der optischen Eigenschaften der Nachweisfelder erfolgt.
18. Verfahren nach Anspruch 17,
10 dadurch gekennzeichnet, daß die optische Änderung der Nachweisfelder durch Isotope, Enzyme, Fluorochrome, Farbstoffe, Metallkolloide oder/und Beads herbeigeführt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18,
15 dadurch gekennzeichnet, daß Latex-Beads, Kunststoff-Beads, Glas-Beads oder/und Metall-Beads verwendet werden.
20. Meßträger zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der
20 Ansprüche 1 bis 19,
gekennzeichnet durch ein scheibenförmiges, aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat (3), auf dem auf einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder (15) in einer Vielzahl von Nachweisfeldern (5, 7) immobilisiert sind, wobei die Nachweisfelder
25 (5, 7) längs mindestens einer Spirallinie (27) oder/und einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien verteilt auf dem Substrat (3) angeordnet sind.
21. Meßträger nach Anspruch 20,
30 dadurch gekennzeichnet, daß über den Nachweisfeldern (5, 7) eine nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern (5,

- 31 -

7) flächig auf das Substrat (3) aufgebrachte Reflexionsschicht (21) angeordnet ist.

22. Meßträger nach Anspruch 21,
5 dadurch gekennzeichnet, daß auf der Reflexionsschicht (21) eine Schutzschicht (25) flächig aufgebracht ist.
23. Meßträger nach Anspruch 22,
10 dadurch gekennzeichnet, daß die Schutzschicht (25) aus einem Material auf Acrylbasis gefertigt ist.
24. Meßträger nach Anspruch 20 bis 23,
dadurch gekennzeichnet, daß er als Handelseinheit verpackt ist.
- 15 25. Meßträger nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet, daß er getrocknet verpackt ist.
- 20 26. Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf mindestens einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird,
25 **dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisfelder magnetisch ausgewertet werden und hierzu Binder oder die nachzuweisenden Analyten mit magnetischen oder/und magnetisierbaren Markern markiert werden und daß die Nachweisfelder längs einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien oder/und längs mindestens einer Spirallinie**
30 **verteilt auf dem Substrat angeordnet werden, gewünschtenfalls in Verbindung mit weiteren Merkmalen mindestens einer der Ansprüche 1 bis 25.**

27. Verfahren nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet, daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe
mit den Nachweisfeldern eine Fixierschicht auf die Nachweisfelder
aufgebracht wird.
- 5 28. Verfahren nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet, daß die Fixierschicht flächig auf jede
Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird.
- 10 29. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29,
dadurch gekennzeichnet, daß für die Fixierschicht ein Material auf
Polymerbasis verwendet wird.
- 15 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29,
dadurch gekennzeichnet, daß vor der Ausbildung der Nachweisfelder
oder nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern
eine magnetische oder/und magnetisierbare Partikel enthaltende
Magnetschicht flächig auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite
des Substrats aufgebracht wird.
- 20 31. Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche
1 bis 19 und 26 bis 30, umfassend
- a) einen mit immobilisierten Bindern (15) vorbereiteten Meßträger
(3),
 - 25 b) Reagenzien zur Durchführung des Nachweisverfahrens,
insbesondere optisch oder/und magnetisch detektierbare
Nachweisreagenzien, und
 - c) ggf. Wasch- oder/und Pufferlösungen.
- 30 32. Testkit nach Anspruch 31,
dadurch gekennzeichnet, daß der Meßträger (3) in getrockneter Form
vorliegt.

- 33 -

33. Verwendung eines Meßträgers nach einem der Ansprüche 20 bis 25 in einem Immunoassay oder/und Nukleinsäurehybridisierungsassay oder/und Lektin-Zucker-Assay oder/und Protein-Nukleinsäureassay.

1 / 1

Fig. 1

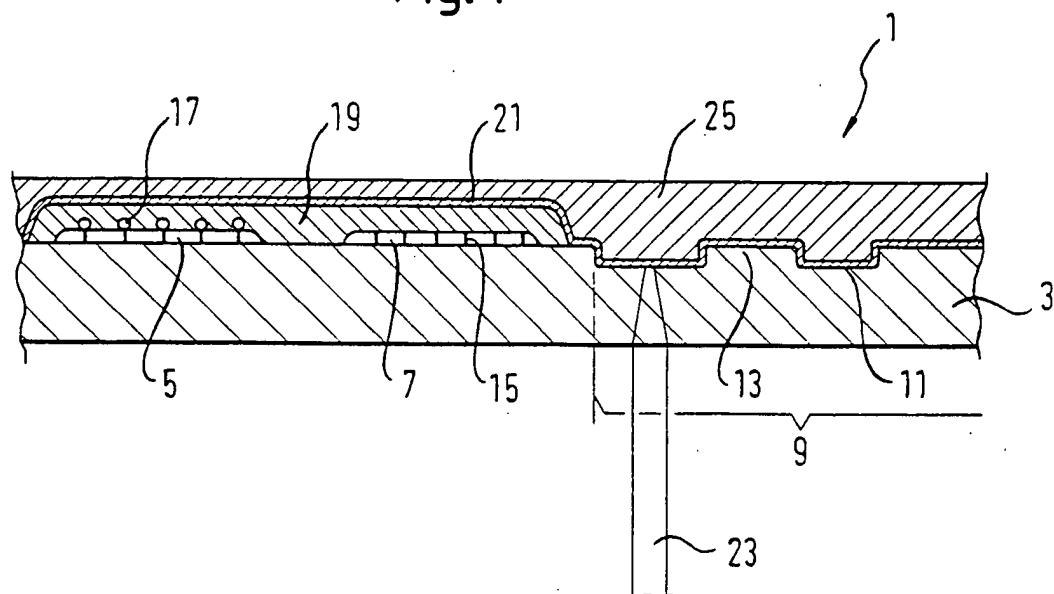
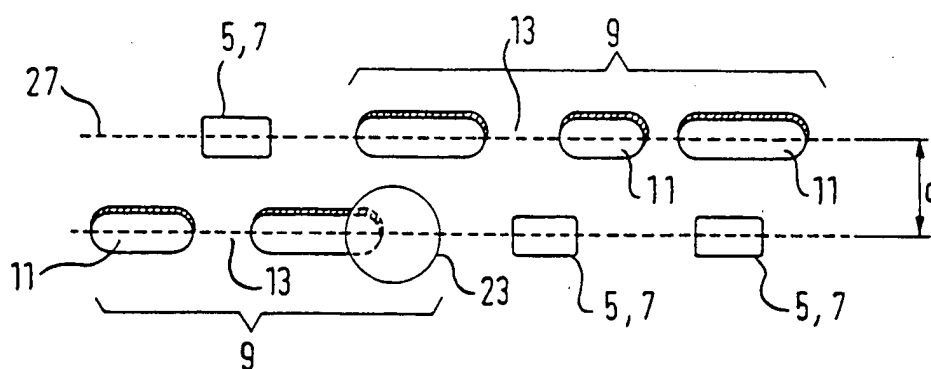


Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/00876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/551 G11B7/013

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N G11B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 09548 A (GORDON JOHN FRANCIS ;UNIV DUNDEE (GB)) 28 March 1996 (1996-03-28) page 2, line 22 -page 3, line 2 page 6, line 18 -page 7, line 13 page 7, line 17-23 page 10, line 16 -page 11, line 20 page 12, line 7-13 page 14, line 5-18 page 8, line 15-19 figures 1-3	1,4-10, 12,17, 18,20, 31-33
Y	— -/-	26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2000

Date of mailing of the international search report

20.10.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Goetz, M

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1 - 25,
31 - 32 (sofern auf Ansprüche 1 - 19 bezogen), 33

- Verfahren zum Nachweis von Analyten mittels eines scheibenförmigen Substrates mit immobilisierten analytspezifischen Bindern in einer Vielzahl von Nachweisfeldern, die in einer Spirallinie oder in konzentrischen Kreisen angeordnet sind, wobei nach dem Inkontaktbringen der Probe mit den Nachweisfeldern ein optischer Reflektor über den Nachweisfeldern angebracht wird
- Messträger zur Durchführung des Verfahrens
- Testkit, enthaltend einen geeigneten Messträger (sofern auf Ansprüche 1-19 bezogen)
- Verwendung des Testträgers

2. Ansprüche: 26 - 30,
31 - 32 (sofern auf Ansprüche 26 - 30 bezogen)

- Verfahren zum Nachweis von Analyten mittels eines scheibenförmigen Substrates mit immobilisierten analytspezifischen Bindern in einer Vielzahl von Nachweisfeldern, die in einer Spirallinie oder in konzentrischen Kreisen angeordnet sind, wobei die Nachweisfelder magnetisch ausgewertet werden.
- Testkit, enthaltend einen geeigneten Messträger (sofern auf Ansprüche 26-30 bezogen)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00876

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9609548 A	28-03-1996	AU 714662 B	06-01-2000
		AU 3481595 A	09-04-1996
		BR 9509021 A	30-12-1997
		CA 2200562 A	28-03-1996
		CN 1158659 A	03-09-1997
		EP 0782705 A	09-07-1997
		JP 10504397 T	28-04-1998
		US 5892577 A	06-04-1999
WO 9812559 A	26-03-1998	AU 4428497 A	14-04-1998
WO 9801533 A	15-01-1998	AU 3958597 A	02-02-1998
		BR 9710702 A	11-01-2000
		CA 2260361 A	15-01-1998
		CN 1230216 A	29-09-1999
		EP 0918845 A	02-06-1999
WO 9605326 A	22-02-1996	AU 3330595 A	07-03-1996